

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Médicas



“Caracterización Morfofuncional y Fenotípica de la
Amígdala Extendida y Estructuras Relacionadas en
Animales Tratados con Dizocilpina”

Trabajo de Tesis para optar al Título de
Doctor en Ciencias de la Salud

Bioquímica Soledad de Olmos

CÓRDOBA
REPÚBLICA ARGENTINA
-2009-

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

Director:

Dr. Alfredo Cáceres

Integrantes:

Prof. Dra. Marta Fiol de Cuneo

Prof. Dra. Nori Tolosa de Talamoni

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

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a dos personas que quiero, respeto y que influyeron tanto en mi vida profesional como personal:

Académico José Severo Ramón de Olmos, PhD. y Dr. Alfredo Guillermo Lorenzo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Cáceres por su consideración al dirigir este trabajo de tesis, y por su apoyo a este proyecto como Director del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC).

A los miembros de la comisión de Tesis, Dra. Martha Fiol de Cuneo y Dra. Nori Tolosa, por sus aportes realizados en las sucesivas reuniones de seguimiento de este proyecto y por el cuidadoso examen del trabajo realizado.

Agradezco al Dr. José Severo de Olmos, mi Padre, Director, Maestro, Amigo y compinche, por enseñarme todo lo que sé. Por ser el ejemplo de un Investigador en el verdadero sentido de la palabra. Extraño tus conocimientos, tu sabiduría, tus chistes, tu compañía, afecto y cariño.

Fredi, no hay palabras que alcanzan a expresar todo lo que siento por vos, y lo importante que fueron, son y serán tus halagos y tus críticas. El apoyo incondicional y tu amor son lo más significativo en mi vida. Sin vos este trabajo no se hubiera terminado de realizar. Te admiro y te quiero.

A Esther de Olmos, gracias por ser mi madre, pero sobretodo por siempre exigirme a ser más de lo que soy. Por tu energía infinita, tu grandioso y generoso apoyo y amor, Gracias.

Al Dr. Adrián Bueno, por ser el alma libre del laboratorio, compañero fiel de trabajo. Gracias por todo. Al Dr. Carlos Beltramino, por su calidez humana y por todos los años compartidos.

Christian, Vero y German, con quienes compartí todos los días en el laboratorio. Son los mejores compañeros de trabajo que uno pudiera pedir. Los recordaré siempre.

Gaby, Bety y Julia. Gracias por la amistad y cariño de todos estos años. Son el mejor motivo para venir a trabajar.

Hijos queridos, Carmen y Alfonso, son el sol de mi vida, lo más importante de todo. Los quiero y gracias por su paciencia!

Al Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra y todo su personal.

Por último quisiera recordar a personas muy queridas que pasaron por el laboratorio y que fueron inspiración y apoyo para la realización de este trabajo: Dr. Lennart Heimer, Dr. George Paxinos, Dr. Lazlo Zaborsky y Dr. Samuel Taleisnik.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	31
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	47
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	84
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA	108

RESUMEN

Los anestésicos disociativos como fenciclidina, ketamina y dizocilpina (MK801), antagonistas no competitivos de los receptores N-metil-D-aspartato (A-NMDA), son psicofármacos que pertenecen a la categoría de drogas de abuso alucinógenas y disociativas. Estas drogas pueden inducir conductas psicóticas en personas sanas y reagudizar la clínica de pacientes diagnosticados con esquizofrenia. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos responsables de los efectos neurotóxicos y conductuales de los A-NMDA. La administración de estas drogas en animales de experimentación ha sido utilizada como un modelo farmacológico para estudiar la hipótesis de la hipofunción del receptor de NMDA en la esquizofrenia. En animales, el efecto biológico de MK801 es dosis-dependiente. Las dosis bajas inducen disturbios del comportamiento y dosis más altas, además, promueven neurotoxicidad en muchas regiones del cerebro, particularmente en la corteza retrosplenial granular (RSG). El efecto neurotóxico de MK801 es sexualmente dimórfico, siendo las hembras marcadamente más sensibles que los machos, no obstante, la participación de las hormonas gonadales en este cuadro es incierto. Aquí demostramos que una sola inyección intraperitoneal (i.p.) de 5 mg/kg de MK801 indujo una intensa neurodegeneración en la RSG de ratas hembras, incluyendo abundante cantidad de somas neuronales degenerados en la capa IV y degeneración dendrítica y terminal en las capas I, IV y V. La neurodegeneración inducida por MK801 en ratas macho fue escasa y principalmente se evidenció por la presencia de unos pocos somas argirofílicos en la capa IV. Las ratas ovariectomizadas (OVX) no fueron perceptiblemente diferentes a las hembras enteras, mientras que los machos orquiectomizados (ORQ) presentaron una robusta degeneración inducida por MK801. La administración de testosterona (TP) y dehidrotestosterona (DHT) inhibió la toxicidad inducida por MK801 en ratas ORQ. En ratas OVX, la DHT, pero no la TP, inhibió la neurotoxicidad inducida por MK801, mientras que en hembras enteras la DHT fue parcialmente protectora. El tratamiento de machos enteros con benzoato del estradiol (EB) realzó perceptiblemente la toxicidad de MK801. En conjunto, nuestros experimentos indican que los andrógenos no-aromatizables protegen a la RSG contra la neurotoxicidad inducida por MK801 mientras que los estrógenos contrarrestan esta protección. Así, el equilibrio de los andrógenos y los estrógenos delimitan el dimorfismo sexual de la RSG frente al efecto tóxico de MK801.

El estudio de la neurodegeneración inducida por MK801 (10 mg/kg) en ratas macho enteras y ORQ reveló degeneración terminal en las áreas corticales del cerebro tales como:

RSG, corteza retrosplenial disgranular (RSD), área mediomedial de la corteza visual secundaria (V2MM), área lateral de la corteza visual secundaria, (V2L), corteza entorhinal (ENT), corteza perirhinal (PRh), corteza ectorhinal (Ect), subiculum (S) y postsubiculum (post); las cuales proyectan directamente y/o indirectamente a la amígdala. Evidencias de otros estudios demuestran que la amígdala estaría implicada en la modulación de la inhibición del prepulso de sobresalto, una medida operacional del bloqueo sensorimotor que se altera en animales bajo efecto de drogas A-NMDA, así como en pacientes diagnosticados con esquizofrenia. Los genes de expresión temprana (GETs), los cuales se expresan como respuesta a determinados estímulos y funcionan como factores de transcripción, se relacionan con mecanismos de plasticidad de la célula. Para estudiar si la neurotoxicidad del MK801 induce modificaciones relacionados a la expresión de GETs en las áreas corticales que proyectan directamente e indirectamente a la amígdala, analizamos la expresión de diversos GETs en la amígdala extendida y en las estructuras que eran sensibles al impacto neurotóxico de MK801. A su vez, estudios anteriores indican que las neuronas GABAérgicas son afectadas por las drogas A-NMDA en la hipofunción de los receptores de NMDA, por lo tanto, para identificar si los grupos de células que expresaron cambios en los GETs a largo plazo eran GABAérgicas, se analizó la expresión de las proteínas ligadas al calcio, calretinina (CR) y parvalbumina (PV) en las áreas sensibles al tratamiento de MK801. Ratas macho enteras y ORQ recibieron 1 inyección i.p. de MK801 (10 mg/kg) o de cloruro de sodio (0,9%) (control). Todos los animales fueron sacrificados a los tres días postadministración, momento que corresponde al pico de la degeneración somatodendrítica y terminal, se perfundieron y sus cerebros se procesaron con técnicas inmunohistoquímicas para revelar la expresión de proteínas c-Fos, FosB, EGR-1, CR y PV. Los análisis demostraron que los procesos neurodegenerativos inducidos por MK801 siguen una expresión prolongada de la inmunorreactividad para c-Fos en la amígdala extendida central, así como en su continuación en la subdivisión dorsolateral del núcleo lateral del lecho de la estria terminal. El mismo tipo de reacción fue observado en V2L y V2MM. Notablemente las áreas corticales más sensibles a la degeneración terminal inducida por MK801, tales como RSG, RSD, V2MM, V2L y ENT, revelaron una expresión significativamente aumentada de FosB/ Δ FOS, y más aun en los animales ORQ. Estos resultados indican que el aumento de degeneración terminal estaría relacionado con el incremento en la inducción del GET. Sorprendentemente la expresión de EGR-1 fue significativamente suprimida en la capa IV de RSG, la cual coincide con la misma área de degeneración somática detectada por las técnicas de A-Cu-Ag y FJB, indicando que la

muerte neuronal estaría asociada a la inhibición de EGR-1. Estas observaciones proveen un nuevo enfoque sobre la neurotoxicidad del MK801, sugiriendo que algunos fenómenos reconstructivos podrían desarrollarse en estas regiones del cerebro después del tratamiento de este A-NMDA. La sensibilidad de la RSG a los procesos neurodegenerativos induciría una cascada de reacciones, a través de sus conexiones eferentes, que provocarían la expresión persistente de GETs en blancos secundarios y terciarios, tales como el RSD, V2L, V2MM, ENT y el núcleo central de la amígdala extendida, indicando que el episodio agudo inducido por el A-NMDA, MK801, en ratas da lugar a los disturbios graves que se podrían asociar a los deterioros duraderos en los comportamientos en los cuales estas estructuras están implicadas.

SUMMARY

The neurotoxic impact of peripherally administered psychopharmaceutical drugs that are non-competitive NMDA receptor antagonists (A-NMDA) on the CNS is well recognized. Prototypes of such drugs are phencyclidine (PCP), ketamine, and dizocilpine (MK801), all of which are dissociative anesthetics and belong to the group of hallucinogens and dissociative drugs. These substances produce psychomimetic effects and neurocognitive disturbances reminiscent to those of schizophrenia; however, the mechanisms responsible are still not clearly understood. The administration of these drugs in animals has been used as a pharmacological model to study the NMDA receptor hypofunction-hypothesis of schizophrenia. In animals, the biological effect of MK801 is dose-dependent. Low doses induce behavioural disturbances and higher doses, in addition, promote neurotoxicity in many brain regions, particularly the granular retrosplenial cortex (RSG). The neurotoxic effect of MK801 is sexually dimorphic, being females markedly more sensitive than males, however the involvement of gonadal hormones has been elusive. Here we show that a single intraperitoneal injection of MK801 (5 mg/kg) induced overt neurodegeneration in the RSG of female rats, including abundant somatic degeneration in layer IV, and somatodendritic and terminal degeneration in layers I, IV and V. MK801-degeneration in males was scarce and mainly evidenced by the presence of few argiophilic somas in layer IV. Ovariectomized rats (OVX) were not significantly different than intact females, while orchietomized rats (ORQ) showed robust MK801-toxicity. Testosterone (TP) and dihydrotestosterone (DHT) inhibited MK801-toxicity in ORQ rats. In OVX rats only DHT, but not TP, prevented MK801-induced degeneration, while in intact females DHT was only partially protective. Treatment of intact males with estradiol benzoate significantly enhanced MK801-toxicity. Altogether, our experiments indicate that non-aromatizable androgens protect RSG from MK801-toxicity, while estrogens counteract this protection. Thus, the balance of androgens and estrogens delineate the sexual dimorphism of the RSG to the toxic effect of MK801.

The study of the neurodegeneration induced by a higher dose of MK801 (10 mg/kg) in intact and ORQ male rats revealed terminal degeneration in cortical areas of the brain such as the RSG, disgranular retrosplenial cortex (RSD), secondary visual cortex mediomedial area (V2MM), secondary visual cortex lateral area (V2L), entorhinal cortex (ENT), perirhinal cortex (PRh), ectorhinal cortex (Ect), subiculum (S) and postsubiculum (Post); some of which project directly and/or indirectly to the amygdala. Evidences from other studies show that the amygdala is involved in the modulation of prepulse inhibition

of startle, an operational measure of sensorimotor gating which is altered in animals under the effect of A-NMDA drugs, as well as in patients with schizophrenia. Immediate early genes (IEGs), which are early expressed in a response to a stimulus and function as transcription factors, are related to mechanisms of cell plasticity. In order to study if the neurotoxicity of the A-NMDA drug, MK801, induced long term changes related to the expression of the IEGs in cortical areas that project direct and indirectly to the amygdala, we analyzed the expression of different IEGs in the extended amygdala and in structures that were sensitive to the neurotoxic impact of MK801. Also, previous studies indicate that GABAergic neurons are affected by A-NMDA drugs in the hypofunction of the NMDA receptors, therefore, in order to identify if the cell groups which expressed long term changes were GABAergic, the expression of the calcium binding proteins, Calretinin (CR) and Parvalbumin (PV), were analyzed in areas sensitive to the treatment of MK801. Male intact and ORQ rats received 1 ip injection of MK801 (10mg/kg) or sodium chloride (0,9%). All animals were sacrificed three days later which is the peak of somatodendritic and terminal degeneration in the brain, perfused and processed for c-Fos, FosB, EGR-1, Cr and PV protein expression. The following analyses showed that the degenerative processes induced by MK801 follow a protracted expression of immunoreactivity for c-Fos in the central extended amygdala, particularly the central subdivision of the central lateral amygdaloid nucleus, as well as its continuation in the dorsolateral subdivision of the lateral bed nucleus of the stria terminalis. The same type of reaction was observed in V2L and V2MM. Interestingly, the cortical areas more sensitive to the terminal degeneration induced by MK801, such as RSG, RSD, V2MM, V2L and ENT, revealed a significantly increased expression of FosB/ Δ FOS, and even more so in ORQ vs intact males. These results suggest that the terminal degeneration would be related to the induction of this IEG. Surprisingly, the expression of EGR-1 was significantly suppressed in layer IV of the RSG, which coincidentally is the same area where somatic degeneration was detected by both A-Cu-Ag and FJB techniques, indicating that the neuronal death would be associated with the inhibition of EGR-1. These observations suggest that some reconstructive phenomena occur in at least these brain regions after MK801 treatment, indicating that the RSG is the most sensitive area to the neurodegenerative processes, and that the efferent connections of these neurons would bring on a cascade of reactions that induce the persistent expression of IEGs in secondary and tertiary targets, such as the RSD, V2L, V2MM, ENT and the central nucleus of the extended amygdala, suggesting that an acute psychotic episode in rats gives rise to grave disturbances that could be associated with lasting impairments in behaviors in which these structures are involved.

ABREVIATURAS

En el proceso de evaluación microscópica del material histológico del sistema nervioso central obtenido de los animales utilizados, se ha seguido la parcelación y nomenclatura propuesta en la última versión editada del atlas estereotáxico de la rata por Paxinos y Watson (198). A los fines de evitar confusiones idiomáticas, las siglas asignadas a las estructuras neuroanatómicas (inicialmente entre paréntesis) corresponden a la de los nombres de las estructuras asignados en inglés. Así, por ejemplo, las siglas correspondientes al “Núcleo del lecho de la estría terminal lateral” serán BSTL, derivadas de la denominación en inglés “Bed nucleus of the stria terminalis, lateral”.

ac: Comisura Anterior

Acb: Núcleo accumbens

Ach: Acetilcolina

A-Cu-Ag: Técnica amino cupro argéntica

AD: Núcleo talámico anterodorsal

AEX: Amígdala extendida

AHI: Área amigdalohipocampal

α_2 : subtipo α_2 del receptor adrenérgico

AMPA/KA: AMPA/kainato

A-NMDA: Antagonista del receptor n-metil-d-aspartato

APir: Área de transición amígdalo-piriforme

APT: Núcleo pretectal anterior

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Au: Corteza auditiva

BL: Núcleo amigdalino basolateral

BMA: Núcleo amigdalino basomedial, división anterior

BOP: Bulbo olfatorio principal

BSTL: Núcleo del lecho de la estría terminal lateral

BSTLd: Núcleo del lecho de la estría terminal lateral división dorsal

BSTLp: Núcleo del lecho de la estría terminal lateral división posterior

BSTLv: Núcleo del lecho de la estría terminal lateral división ventral

BSTM: Núcleo del lecho de la estría terminal medial

BSTMA: Núcleo del lecho de la estría terminal medial división anterior

BSTMP: Núcleo del lecho de la estría terminal medial división posterior

BSTS: Núcleo del lecho de la estría terminal supracapsular
CA1: Campo CA1 del hipocampo
CA3: Campo CA3 del hipocampo
CaBP: Proteínas ligadas al calcio
Ca⁺²: Ión calcio
CeL: Núcleo amigdalino central, área lateral
CeLCn: Núcleo amigdalino central división central
CeLC: Núcleo amigdalino central división capsular
CeM: Núcleo amigdalino central, área medial
CeMAD: Núcleo Amigdalino central división medial anterodorsal
cc: Cuerpo calloso
cg: Cíngulo
ClNa: Cloruro de sodio
CPu: Caudado putamen
CR: Calretinina
Cst: comisura de la estria terminali
DHT: Dehidrotestosterona
DG: Giro dentado
dhc: Comisura dorsal hipocampal
DT: Área de transición peduncular dorsal
EB: Benzoato de estradiol ó estrógeno
ECT: Corteza ectorrhinal
EGR-1: Early growth response 1
ENT: Corteza entorrhinal
FJB: Fluoro-Jade B
FR2: Corteza frontal dorsomedial
fmj: Cuerpo calloso forceps mayor
G_A: Subtipo GABA_A del receptor de GABA
GABA: Acido γ -aminobutírico
GETs: Genes de expresión temprana
GFAP: Proteína ácida glial
Glu: Glutamato
GP: Globo pálido
5HT: Serotonina

HSP72: Heat shock protein 72
ic: Cápsula interna
IG: Induseum griseum
i.p.: Intraperitoneal
LD: Núcleo talámico lateral dorsal
LOT: Núcleo del tracto olfatorio lateral
LP: Núcleo talámico lateral posterior
M2: Corteza motora secundaria
m₃: Subtipo m₃ del receptor colinérgico muscarínico
MK801: Dibenzocicloheptenimina o dizocilpina maleato (5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate
Me: Núcleo amigdalino medial
MeAD: Núcleo amigdalino medial anterodorsal
MeAV: Núcleo amigdalino medial anteroventral
MePD: Núcleo amigdalino medial posterodorsal
MePV: Núcleo amigdalino medial posteroventral.
MT: Área de transición peduncular medial
NIDA: Instituto Nacional para el Abuso de Drogas de EEUU
NMDA: N-metil-d-aspartato
NE: Norepinefrina
Opt: Tracto óptico
OT: Núcleo del tracto óptico
Or: capa de Orions del hipocampo
ORQ: Orquiectomizado
OVX: Ovariectomizada
PCP: Fenciclidina
PIR: Corteza piriforme
PLCO: Núcleo amigdalino cortical pósterolateral
PoDG: Capa polimórfica del giro dentado
Post: Postsubiculum
PRh: Corteza postrhinal
PV: Parvalbúmina
RSD: Corteza retrosplenial disgranular
RSG: Corteza retrosplenial granular

RSGa: Corteza retrosplenial granular a
RSGb: Corteza retrosplenial granular b
Rt: Núcleo talámico reticular
 σ : Sitio sigma
S: Subiculum
S1: Corteza somatosensorial primaria
S2: Corteza somatosensorial secundaria
SC: Colículo superior
scc: Espleno del cuerpo calloso
SNC: Sistema nervioso central
st: Estria terminali
TeA: Corteza de asociación temporal
TP: Propionato de testosterona
TTd: Taenia tecta dorsal
TTv: Taenia tecta ventral
vh: Vehículo
V1MM: Corteza visual primaria medial
V2L: Corteza visual secundaria lateral
V2MM: Corteza visual secundaria mediomedial
VL: Ventrículo lateral
 Zn^{+2} : Ión zinc

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Uso recreacional de los anestésicos disociativos

Las sustancias psicotrópicas son agentes químicos que actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) cambiando la percepción, el estado de ánimo, el comportamiento y el grado de conciencia. A lo largo de la historia, diferentes culturas han utilizado estas sustancias con el propósito de alterar deliberadamente el estado de la mente. En la actualidad, muchos psicotrópicos son utilizados en medicina para el tratamiento de diversas condiciones neurológicas o psiquiátricas (psicofármacos), pero además, el uso de drogas psicoactivas con fines “recreativos” es un fenómeno frecuente. Los psicotrópicos disociativos como ketamina y fenciclidina son un ejemplo (114, 213). La fenciclidina o PCP distribuida por Parke Davis, fue comercializada bajo el nombre de Sernyl en 1957 como anestésico hospitalario, pero, debido a los fuertes efectos alucinógenos y psicoticomiméticos secundarios fue retirado del mercado en 1965. Comienza entonces a venderse bajo el nombre de Sernylan para su uso veterinario, pero en 1978 debido a la extensión de su uso como droga recreacional en los ambientes “underground” (donde se lo conoce como “píldora de la paz”, “polvo de ángel” o “superpasta”) se prohíbe también su uso en veterinaria. La ketamina, sintetizada por Calvin Stevens en 1962 con la intención de sustituir al PCP por un producto más seguro y médicamente más útil, fue introducida en la clínica hospitalaria en 1970 y poco después fue ampliamente utilizada en la guerra del Vietnam. Actualmente continúa teniendo uso médico, especialmente en pediatría y geriatría y también se utiliza en la clínica veterinaria (117). Por otro lado, la ketamina a dosis subanestésicas es un agente psicodélico, y su uso como droga “recreacional” comenzó a ser cada vez más popular (116). Probablemente, el más renombrado usuario haya sido J. C. Lilly (famoso por sus aportes a la psicología y por ser pionero en el estudio de la inteligencia y la comunicación de los delfines), quien descubrió las propiedades de la ketamina cuando le fue prescrita por un médico amigo para tratar migrañas recurrentes que padecía (la ketamina tiene un alto poder analgésico). A partir de entonces continuó con el uso diario de la droga durante semanas, siendo internado tiempo después en un centro psiquiátrico por psicosis paranoide (114). Lilly cuenta sus experiencias bajo el efecto de ketamina en su obra autobiográfica "The Scientist" (144).

Si bien la dependencia física a ketamina o PCP no está clínicamente constatada, sí se han reportado casos de fuerte dependencia psicológica, o el desarrollo de tolerancia no reversible o escasamente reversible (147). Un problema adicional al consumo habitual de

PCP o ketamina es la aparición de ataques de pánico y ansiedad, problemas de memoria, dificultades de concentración y una alta incidencia de conductas psicoticomiméticas (119, 141). Dichos efectos son muy duraderos, persistiendo incluso por meses o años luego de haber suspendido el consumo (8, 119). Bajo los efectos de los anestésicos disociativos, la persona puede perder el control de sus actos durante varias horas, llegando incluso a perder la memoria y la conciencia. Esto puede generar situaciones enormemente peligrosas, sobre todo si se tiene en cuenta la capacidad analgésica de estas drogas. Se ha reportado que bajo los efectos de anestésicos disociativos personas deprimidas buscan el suicidio y personas agitadas se vuelvan agresivas o muy violentas.

Desafortunadamente, el uso indebido de PCP y ketamina con el fin de experimentar sus efectos psicodélicos es cada vez más habitual en fiestas y discotecas (93, 148, 169, 264). En una encuesta realizada en Estados Unidos en 2006 se reveló que 187.000 jóvenes de 12 años o mayores habrían abusado de PCP por lo menos 1 vez dentro del año (*National Survey on Drug Use and Health*; <http://www.samhsa.gov/>). Por su parte, en su estudio publicado en 2007, el Instituto Nacional para el Abuso de Drogas de EEUU (*NIDA, Monitoring the future survey*: <http://www.drugabuse.gov/infofacts/hallucinogens.html>) muestra que el 0,9% de los estudiantes del último año escolar habían abusado de PCP por lo menos una vez dentro del año escolar. Si bien no existen cifras oficiales del consumo no médico de estas sustancias en Argentina, el aumento de su abuso ha sido apuntado por los medios de comunicación en artículos como “Una droga animal” (*La Voz del Interior*, 13-01-2008), lo que indica que también en nuestro país el mal empleo de estas sustancias es cada vez más popular. Estas observaciones indican que el abuso de los anestésicos disociativos es un creciente problema social y médico.

Por otro lado, el hecho que los anestésicos disociativos generen conductas que se asemejan a las observadas en desordenes psiquiátricos (ver más adelante), ha despertado el interés de la comunidad científica por encontrar los mecanismos anatómofuncionales que subyacen al efecto de estas drogas como una posible vía para esclarecer patologías psiquiátricas humanas.

Antagonistas no competitivos del receptor NMDA: PCP, ketamina y MK801

En 1982 la dibenzocicloheptenimina o maleato de dizocilpina (5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate), más comúnmente denominado MK801, fue sintetizado y se reportaron sus potentes propiedades anti-convulsivas. Este compuesto, al igual que la ketamina y el PCP, pertenece al grupo de psicofármacos arilciclohexilamínicos que son antagonistas no competitivos del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA). El receptor NMDA es ionotrópico permeable al ión calcio (Ca^{+2}) y su activación requiere la unión de glutamato y glicina. Por lo tanto, los antagonistas competitivos del receptor NMDA bloquean el sitio específico del glutamato o de la glicina, mientras que los antagonistas no-competitivos del receptor NMDA (A-NMDA) se unen a sitios alostéricos o bloquean el flujo de Ca^{+2} uniéndose a un sitio específico dentro del canal. Este último mecanismo de acción caracteriza a MK801, PCP y ketamina (270); sin embargo, el MK801 es el que posee la mayor afinidad y especificidad por el canal iónico, siendo entre 2 y 3 veces más potente (119, 127, 231).

Por otra parte PCP se une a receptores sigma en el cerebro (269) y altera el metabolismo de dopamina debido a que inhibe su recaptación (236). Por el contrario, MK801 no tiene efectos sobre dopamina ni sobre los receptores sigma (231), siendo por tanto altamente específico para el receptor NMDA. Esta alta especificidad de MK801 por el receptor NMDA y sus casi nulos efectos ligados a otros sistemas de neurotransmisores, lo hacen una herramienta de extrema utilidad para diseccionar el papel de la neurotransmisión glutamatérgica-NMDA en los cambios anatomofuncionales, degenerativos y conductuales inducidos por drogas disociativas.

Efectos conductuales de los A-NMDA

En humanos, el efecto comportamental causado por los A-NMDA ha sido caracterizado a través del uso de PCP y ketamina por observaciones hospitalarias o por medio de estudios experimentales realizados en condiciones controladas (137, 138). El PCP fue introducido en la década de 1950 como una droga para cirugía, cuyo atributo consistía en sus propiedades analgésicas y anestésicas, sin provocar depresión respiratoria y circulatoria. Al administrar la droga, el paciente entra en un estado donde la percepción del dolor se disocia de la sensación del dolor, de allí que se denominó “anestésico

disociativo” (61). En dosis bajas o moderadas, los efectos de la PCP incluyen un leve aumento en la frecuencia respiratoria y una elevación pronunciada de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca acompañadas de rubor y sudor profuso. También puede ocurrir un adormecimiento generalizado de las extremidades y pérdida de la coordinación muscular. En dosis altas, PCP puede reducir la presión arterial y las frecuencias cardíaca y respiratoria. Esto puede ir acompañado de náusea, vómito, visión borrosa, movimientos rápidos de los ojos hacia arriba y hacia abajo, babeo, pérdida del equilibrio y mareo. El PCP fue eliminado del uso clínico debido a sus efectos colaterales negativos que incluyen reacciones post-operatorias que se denominaron “fenómenos de delirio emergentes de anestesia” (175, 237). Este fenómeno se caracteriza por llanto incontrolable, excitación, desorientación, alucinaciones y paranoia. Las conductas inducidas por PCP en humanos normales se asemejan a los síntomas de pacientes esquizofrénicos, incluyendo manifestaciones tanto de signos positivos como paranoia, alucinaciones auditivas, agitación descontrolada, como de síntomas negativos, tales como apatía, pobreza de pensamiento, retraimiento social y déficit cognitivos (1, 2, 119, 138, 141, 189). Estos síntomas, en algunos casos, pueden persistir 2 o más semanas después de una sobredosis de la droga (119, 123, 168). En algunos casos el diagnóstico de sobredosis con PCP se hace indistinguible del síndrome esquizofrénico (143, 168), siendo necesario para el diagnóstico diferencial recurrir al análisis con cromatografía gaseosa para detectar PCP y sus metabolitos (119). A su vez, PCP también exacerba conductas psicóticas en pacientes con esquizofrenia. Por estas razones, PCP fue clasificado como droga psicótico-mimética y comenzó a ser empleada por diferentes laboratorios para generar modelos animales de esquizofrenia (ver más adelante). Las personas que abusan de la PCP por períodos prolongados informan que tienen trastornos emocionales, pérdida de la memoria, dificultades con el habla y el pensamiento, depresión y pérdida de peso. Estos síntomas pueden persistir hasta por un año después de haber dejado de usar la droga (119, 149). PCP tiene efectos sedantes y la interacción con otras drogas depresoras del sistema nervioso central, tales como el alcohol o las benzodiazepinas puede llevar al individuo a un estado de coma (www.drugabuse/infocact/hallucinogens). Las sobredosis de PCP también pueden causar convulsiones, coma, y muerte (aunque la muerte frecuentemente es el resultado de las lesiones accidentales o del suicidio que se produce cuando el usuario está intoxicado).

La ketamina por su parte fue inicialmente utilizada para uso veterinario, donde sigue siendo muy popular. La administración intravenosa de ketamina a humanos

normales genera un síndrome caracterizado por aislamiento social, aplanamiento afectivo, abulia, alteraciones formales del pensamiento y alucinaciones auditivas y visuales. Estas manifestaciones parecen exacerbarse en situaciones en las que existe gran cantidad de estímulos ambientales y se atenúan con privación sensorial, lo que sugiere que el efecto de los A-NMDA podría deberse a una interferencia con el procesamiento de la información. La ketamina altera la función ejecutiva, la fluencia verbal y la memoria verbal declarativa (141, 155, 156, 171, 172, 188, 189). La ketamina también posee efectos psicótico-miméticos reversibles e influenciados por condiciones como el tiempo de exposición, la dosis y la vía de administración. La susceptibilidad a los efectos psicótico-miméticos de ketamina es mínima o ausente en niños y llega a ser máxima en edad adulta temprana. La administración experimental de ketamina en pacientes esquizofrénicos previamente estabilizados con antipsicóticos típicos conlleva la reaparición de alucinaciones, trastornos formales del pensamiento e ideas delirantes y genera un franco empeoramiento en la ejecución de tareas que examinan la memoria de evocación y el reconocimiento. Es llamativo que estas manifestaciones se ven reducidas con el tratamiento de clozapina, pero no con haloperidol. (141, 155, 243).

Por su parte, el MK801 nunca fue aprobado para su uso en humanos ya que en estudios de conducta con animales mostró las mismas propiedades psicótico-miméticas que PCP (133). Es por ello que el MK801 también tiene el potencial de ser empleado abusivamente como droga recreacional (43), con el agravante de que poco se sabe sobre sus efectos, dosis y menos aún, riesgos. La elevada potencia del MK801 hace más difícil de controlar su dosificación cuando se compara con otras drogas similares, por lo tanto el riesgo de sobre-dosificación es alto. Los individuos que usaron esta droga tienden a divulgar que la experiencia no es tan agradable como con otras drogas disociativas, y a menudo es acompañada por alucinaciones auditivas fuertes. A su vez, el MK801 presenta un efecto más duradero que las drogas disociativas similares, como ketamina y PCP, y además causa peores efectos de amnesia y déficit residual en el pensamiento, lo que ha obstaculizado su aceptación como droga recreacional. A pesar de ello, existen evidencias de que en los últimos años se habría incrementado el consumo y abuso del MK801, habiéndose incluso reportado la muerte por la sobredosis de esta droga (175).

La administración de A-NMDA en animales se ha empleado como modelo farmacológico de esquizofrenia. Comparado con otros modelos animales de la patología, este (inducción por A-NMDA) tiene la importante ventaja de poseer un paralelo clínico en humanos muy bien caracterizado. Además, a diferencia de otros modelos

farmacológicos, como el de amfetamina, el modelo que utiliza A-NMDA no requiere una administración crónica para inducir la expresión de la psicosis. Otro aspecto importante del modelo A-NMDA es que, al igual que en los humanos, los animales con A-NMDA no responden a terapias antipsicóticas convencionales como haloperidol, pero sí a clozapina (101, 164).

En subprimates, como el macaco de la India, dosis bajas de estas drogas tienen un efecto relajador con una leve ataxia, y normalmente monos agresivos se calman significativamente. A dosis más altas, los animales presentan un estado cataléptico. Frecuentemente se produce nistagmia y salivación marcada. Aunque los monos están inmóviles, pueden llegar a presentar movimientos exagerados de los miembros y de la boca; sus ojos continúan abiertos; sin embargo, los animales son insensibles a los acontecimientos ambientales. Estas características comportamentales, tales como insensibilidad, ataxia y nistagmia son muy similares a las reportadas por altas dosis en seres humanos (21). En la rata, los A-NMDA inducen alteraciones comportamentales que van desde estimulación motora como hiperactividad y olfateo estereotipado a ataxia, balanceo de la cabeza y enrollamiento del cuerpo en función de la dosis utilizada (12, 237). Administraciones repetidas de estas sustancias producen tolerancia y sensibilización a conductas psicomotoras en diferentes paradigmas experimentales (238). En los últimos años se han puesto de manifiesto aspectos conductuales específicos que son alterados por estas drogas y que concuerdan llamativamente con lo observado en humanos. Así, se pueden describir síntomas positivos a través de actividad locomotora (174, 180, 240) y síntomas negativos mediante pruebas de comportamiento e interacción social (137, 174). También déficit cognitivos funcionales pueden medirse a través de la memoria de trabajo, el aprendizaje espacial y la inhibición prepulso (85, 101, 120, 121, 157 158, 174, 179,). El test de la inhibición prepulso permite una medida operacional muy efectiva del filtro sensorial, el cual es altamente deficitario en pacientes esquizofrénicos (28, 29, 30, 118, 174). Es de interés mencionar que en animales tanto MK801 como PCP o ketamina muestran un marcado efecto inhibitorio sobre este parámetro conductual (18, 19, 20, 84, 174). Más aún, la disminución de la inhibición prepulso en pacientes esquizofrénicos, o inducida farmacológicamente en animales por medio de MK801 o PCP, es antagonizada por la administración de antipsicóticos atípicos como clozapina, olanzapina y remoxipride (18, 85, 118, 145).

En conjunto, numerosas evidencias experimentales indican que la administración de A-MNDA en animales induce cambios conductuales semejantes a los que caracterizan

a los pacientes con esquizofrenia y por lo tanto son herramientas útiles para el estudio de las bases anatomofuncionales de esa enfermedad.

Modelo de psicosis basado en la hipofunción del receptor NMDA inducida por los A-NMDA

Considerando que los A-NMDA inducen cuadros psicóticos similares a los esquizofrénicos, Olney y Farber propusieron la hipótesis de la hipofunción del receptor NMDA para explicar cambios comportamentales en la esquizofrenia (38, 68, 193, 196). Según esta hipótesis, existiría una hipofunción NMDA en neuronas GABAérgicas talámicas y de la banda diagonal de Broca, ello generaría un estado de hiperactividad con la consiguiente excesiva liberación de glutamato y acetilcolina hacia áreas de proyección en la corteza retrosplenial (89, 100, 129, 166, 167, 190). Se ha propuesto que esta liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios y la sobre-estimulación resultante de neuronas postsinápticas corticales podrían explicar los disturbios cognitivos y del comportamiento asociados al estado de la hipofunción del receptor NMDA en pacientes esquizofrénicos o en sujetos bajo el efecto de A-NMDA (166, 193).

En la rata adulta, con dosis de A-NMDA aproximadamente iguales a o superiores a las necesarias para producir elevaciones detectables en la liberación de neurotransmisores se pueden apreciar claros signos de neurotoxicidad en el SNC. Inicialmente, se ven cambios neurotóxicos reversibles en neuronas piramidales en la corteza retrosplenial (194), pero si el bloqueo del receptor de NMDA se mantiene por un tiempo prolongado, neuronas de la corteza retrosplenial y algunas otras regiones corticales y límbicas sufren degeneración irreversible (33, 34, 44, 65, 111). La muerte neuronal observada luego de la administración de A-NMDA es paradójica ya que el bloqueo de receptores NMDA protege del la muerte neuronal inducida por convulsiones corticales focales, o por daño hipóxico/isquémico (17, 48, 197, 218). Una explicación mecánica para esta aparente paradoja fue propuesta por Olney y supone la desregulación de un complejo circuito multisináptico (193, 196). Así, la toxicidad no ocurriría por la directa inhibición del receptor NMDA en las neuronas corticales que sufren degeneración. Por el contrario, su bloqueo en neuronas GABAérgicas subcorticales, principalmente talámicas y de la banda diagonal de Broca, conllevaría a una pérdida de control inhibitorio sobre neuronas excitatorias, tanto colinérgicas del

telencéfalo basal como glutamatérgicas del tálamo, que proyectan directamente a la corteza. Como resultado de ello, la muerte de las neuronas de la corteza retrosplenial ocurriría por un exceso de estimulación a través de receptores muscarínicos y AMPA (Figura 1). Además, la hipofunción NMDA también afectaría a neuronas noradrenérgicas y serotoninérgicas que también controlan la actividad de las neuronas GABAérgicas talámicas (69, 70, 71, 129). Un mecanismo diferente, pero también basado en una compleja desregulación polisináptica ha sido propuesto para explicar la degeneración neuronal en el bulbo olfatorio (33), otra de las regiones altamente sensibles a los efectos neurotóxicos de los A-NMDA. Por otra parte, dosis bajas de A-NMDA que no son suficientes para causar muerte neuronal, promoverían cambios comportamentales a través de una alteración funcional de esos circuitos polisinápticos. En el caso particular de la corteza retrosplenial, siendo que la vía de salida de este circuito son las neuronas corticales y que la actividad de las mismas está automodulada por colaterales sobre neuronas GABAérgicas corticales vecinas (Figura 1), el bloqueo de receptores NMDA de esas neuronas inhibitorias resultaría en un descontrol excitatorio de la salida de la corteza retrosplenial hacia los campos de proyección (71, 193, 194). Por lo tanto, el modelo de circuito propuesto del Olney y Farber resulta operacionalmente útil para explicar tanto el efecto conductual de los A-NMDA como sus efectos neurodegenerativos sobre las neuronas corticales. Sin embargo, la identificación de los blancos neuroanatómicos afectados por los cambios en la excitabilidad y/o degeneración de las neuronas corticales es fundamental para la comprensión de las bases anatómicas que subyacen al efecto de los A-NMDA y, posiblemente, a patologías psiquiátricas muy complejas como la esquizofrenia.

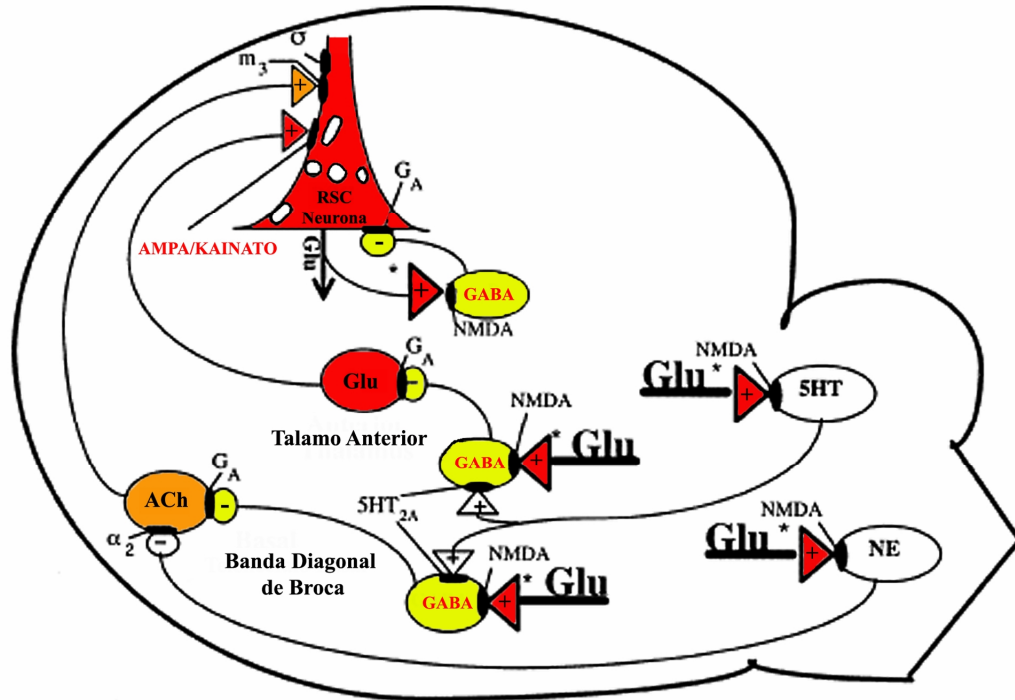


Figura 1: Trazado del circuito de la hipofunción del receptor NMDA. Glutamato, actuando a través de los receptores NMDA en neuronas GABAérgicas, serotoninérgicas, y noradrenérgicas, mantiene un control inhibitorio tónico sobre dos caminos excitatorios importantes que convergen e inervan las neuronas de la corteza retroesplena (RSC). La administración sistémica de un A-NMDA bloquea los receptores NMDA, de modo tal que suprime el control inhibitorio sobre ambas entradas excitatorias a la neurona de la RSC. Las vías excitatorias desinhibidas simultáneamente hiperactivan a la neurona de la RSC, creando la disrupción caótica de múltiples sistemas de señalización intracelulares, causando de tal modo el desbalance inmediato de las funciones cognitivas asistidas por las neuronas afligidas (efectos psicótico-miméticos), y puede producir la lesión neuronal reversible o irreversible, dependiendo de cuanto tiempo dure la interrupción. Este esquema se enfoca exclusivamente en las neuronas de la RSC. Se presume que un mecanismo similar de desinhibición y de mecanismos de circuitos y de receptores no necesariamente idénticos a este median el daño inducido en otras regiones corticolímbicas del cerebro por la sostenida hipofunción del receptor NMDA. (+): entrada excitatoria; (-): entrada inhibitoria; ACh: acetilcolina; NE: norepinefrina; Glu: glutamato; GABA: ácido γ -aminobutírico; 5HT: serotonina; α_2 : subtipo α_2 del receptor adrenérgico; G_A: subtipo GABA_A del receptor de GABA; m₃: subtipo m₃ del receptor colinérgico muscarínico; AMPA/KA : subtipo AMPA/KA del receptor de Glu; NMDA: subtipo NMDA del receptor de Glu; σ : sitio sigma; 5HT_{2A}: subtipo 5HT_{2A} del receptor de serotonina. Los asteriscos indican los sitios postulados en donde las entradas de la dopamina pueden regular presinápticamente el lanzamiento de Glu. Tomando de Farber 2003.

Es curioso destacar que varios trabajos han reportado que las hembras son notoriamente más sensibles que los machos a los efectos del MK801 y del PCP (12, 16, 34, 49, 76, 108, 112, 266, 276). Esta sensibilidad sexualmente dimórfica puede observarse claramente por los cambios comportamentales y neurodegenerativos desencadenados por estas sustancias. Por ejemplo, a igual dosis el efecto sedativo/anestésico de MK801 puede mantenerse por hasta 24 hs en la hembra, mientras que los machos recuperan sus actividades normales luego de 6 hs (observaciones personales, 276). Coincidente con ello, una misma dosis de MK801 es capaz de causar la muerte de gran cantidad de neuronas en hembras, mientras que en el macho no induce toxicidad aparente (12, 16, 76, 108, 166, 176). También se han reportado diferencias entre machos y hembras en la expresión de c-Fos en un modelo de abuso de drogas (49). Teniendo en cuenta que MK801 y PCP son degradados en el hígado y que se han encontrado diferencias sexualmente dimórficas a nivel de metabolismo hepático (12, 180, 181, 228), se propuso que las diferencias en el efecto de A-NMDA podrían ser explicadas, al menos en parte, por esos mecanismos sistémicos que cambiarían la vida media de la droga y su disponibilidad cerebral de manera diferente en machos y hembras. Sin embargo, la magnitud de las diferencias sugiere la existencia de mecanismos celulares y moleculares a nivel del SNC como el sustrato principal del efecto sexualmente dimórfico de los A-NMDA. Interesantemente, no existen datos experimentales sobre las bases anatómicas y funcionales de las diferencias sexuales a los efectos de las drogas de abuso (22). A modo de ejemplo, es notable que no se haya analizado aún el posible rol de las hormonas gonadales sobre el efecto de los A-NMDA, esos datos podrían abrir el camino para comprender las bases del dimorfismo sexual en la respuesta a los A-NMDA y podrían contribuir a esclarecer las bases anatomofuncionales de la diferencia sexual observada en el consumo abusivo de drogas.

Alteraciones neuroanatómicas inducidas por MK801

En sus trabajos pioneros Olney y col (194, 195) observaron que el tratamiento sistémico con altas dosis de A-NMDA fue acompañado de vacuolización neuronal en estructuras específicas del SNC, sugiriendo un efecto neurotóxico ligado a los efectos conductuales inducidos por los A-NMDA. Estas observaciones llevaron a la paulatina

identificación de las estructuras cerebrales blancas del efecto de los A-NMDA. Así, empleando técnicas histoquímicas como la hematoxilina-eosina fue posible identificar, en base a la presencia de vacuolizaciones citoplasmáticas, poblaciones neuronales vulnerables a los efectos tóxicos de los A-NMDA. Estas poblaciones fueron sistemáticamente observadas en la corteza retrosplenial (74, 76, 194, 195, 227, 246), sugiriendo que neuronas de esa área cortical son blancas primarias del efecto neurotóxico de MK801 y otros A-NMDA. La posibilidad de que la corteza retrosplenial sea el blanco primario del efecto neurotóxico del MK801 y otros A-NMDA fue también confirmada mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas contra la proteína HSP72 (“heat shock protein 72”), que identifica poblaciones neuronales bajo estrés, o contra la proteína ácida glial (GFAP), que sirve para identificar áreas cerebrales con gliosis reactiva (44, 183, 183, 226, 227). Mediante el empleo de técnicas de plata capaces de detectar múltiples elementos de desintegración neuronal se identificó degeneración neuronal inducida por MK801 no solo en la corteza retrosplenial, sino también en las cortezas piriforme y entorrinal (33, 34, 111, 113, 190, 276). Por otra parte, mediante el empleo de la técnica de hibridación “in situ” contra el RNA mensajero de c-Fos, utilizado como marcador anatómico funcional del efecto de MK801, se reportó un aumento moderado de la expresión en cortezas piriforme y entorrinal, la capa III de las cortezas cingular posterior y retrosplenial, la capa III-IV de la neocorteza y el tálamo (80, 81, 134, 183, 247). El patrón de expresión de FosB, otro gen de expresión temprana de la familia del Fos, cuya expresión sostenida estaría implicada en plasticidad neuronal, efectos a largo plazo de cocaína y cambios comportamentales debidos al tratamiento prolongado con antipsicóticos como el haloperidol y la clozapina (41, 126, 173, 187, 215), también fue analizado luego de la administración de MK801. Ese estudio indica que la expresión de FosB luego de MK801 fue altamente pronunciada en las cortezas cg y corteza retrosplenial, seguida en densidad y cantidad de expresión por la capa IV, y en menor medida, por las capas V y VI de la neocorteza (81). El estudio de los cambios de expresión de estos dos genes de expresión temprana sugiere que las alteraciones inducidas por los A-NMDA exceden a la corteza retrosplenial. Más recientemente, mediante el empleo de la técnica amino cupro argéntica (A-Cu-Ag) fue posible realizar un mapeo más detallado no sólo de las áreas con degeneración somática, sino también de regiones cerebrales afectadas por degeneración terminal (33, 34). En estos trabajos se presentó una información anatómica detallada y completa sobre los efectos neurodegenerativos inducidos por MK801, confirmándose que en la rata hembra

la degeneración más prominente se presenta entre las 60-72 horas postratamiento y con cuadros típicos de lesiones excitotóxicas en algunas áreas cerebrales, y de tipo apoptótico en otras. Brevemente, las alteraciones provocadas por la acción neurotóxica del MK801 confirmaron la susceptibilidad de la corteza retrosplenial, pero además pusieron en evidencia muerte neuronal en corteza piriforme (PIR), áreas de transición peduncular dorsal (DT) y medial (MT), taenia tecta ventral (TTv), corteza entorhinal (ENT) lateral y medial, núcleo amigdalino cortical pósterolateral (PLCO), bulbo olfatorio principal (BOP) y giro dentado (DG). Se encontró degeneración de terminales en corteza retrosplenial, área de transición amígdalo-piriforme (APir), el campo CA1 del asta de Ammon del hipocampo (CA1), la taenia tecta dorsal (TTd), el induseum griseum rostral (IG), las ENT medial y lateral, cíngulo (Cg) anterior y posterior, áreas neocorticales sensoriales y áreas parahipocampales como corteza postrhinal (PRh), perirhinal, ectorhinal (ECT) y subiculum (S) (observaciones personales, 33, 34).

En conjunto estos estudios indican que numerosas áreas cerebrales son afectadas por el tratamiento con A-NMDA, siendo la corteza retrosplenial una estructura particularmente vulnerable al efecto neurotóxico de los mismos. Además, numerosas regiones hodológicamente relacionadas a la misma también estarían implicadas; sin embargo, la relación anatómofuncional entre las mismas y sus implicancias con el efecto tóxico y degenerativo con MK801 siguen siendo pobremente entendidos. Una comprensión más detallada de estas relaciones sería fundamental para esclarecer el rol funcional de estas estructuras en los cambios comportamentales inducidos por los A-NMDA.

La corteza retrosplenial

La corteza retrosplenial de la rata (a veces denominada área cingular posterior), cubre la cara interna y algo del borde medial dorsal del hemisferio del cerebro (Figura 2 A). En base a datos estructurales, histológicos, citológicos, inmuno-arquitectónicos y de mapeo radioautográfico de numerosos receptores, existe consenso en reconocer dos grandes divisiones dentro de la corteza retrosplenial: la corteza retrosplenial disgranular (RSD) y la corteza retrosplenial granular (RSG), con tres subdivisiones (RSGa, RSGb y RSGc) definidas anatómicamente (251-254, 259, 260, 279) (Figura 2 A).

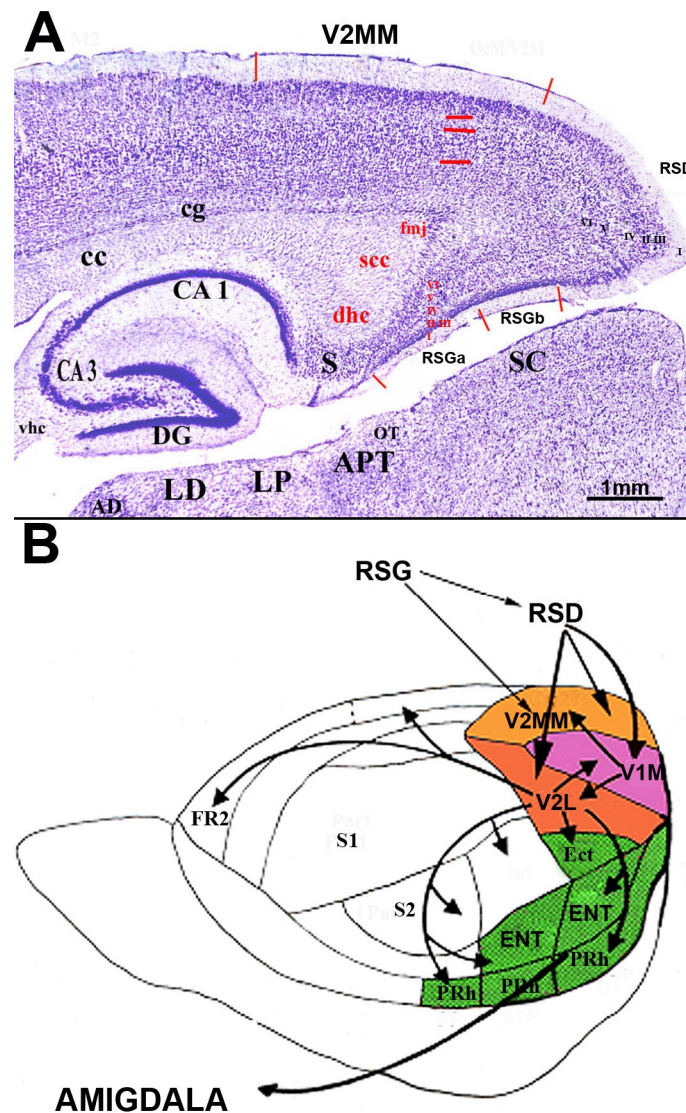


Figura 2: Citoarquitectura y conexiones de la corteza retrosplenial. **(A)** Microfotografía de bajo aumento de un corte sagital (lat. 1,13 mm) de la corteza retrosplenial y estructuras vecinas del cerebro de la rata teñida con la técnica de Nissl. Las líneas rojas horizontales a la capa superficial del cerebro marcan las diferentes capas de la corteza visual secundaria mediomedial (V2MM). Los números romanos negros (I-VI) marcan las diferentes capas de la corteza retrosplenial disgranular (RSD). Los números romanos rojos (I-VI) marcan las diferentes capas de la corteza granular a y b (RSGa y RSGb). Abreviaturas: AD núcleo talámico anterodorsal; APT: núcleo pretectal anterior; CA1: Campo CA1 del hipocampo; CA3: Campo CA3 del hipocampo; cc: Cuerpo calloso; cg: Cíngulo; DG: Giro dentado; dhc: Comisura dorsal hipocampal; fmj: Cuerpo calloso forceps mayor; LP: Núcleo talámico lateral posterior; LD: Núcleo talámico lateral dorsal; OT: Núcleo del tracto óptico; S: Subiculum; SC: Colículo superior, scc: esplenio del cuerpo calloso **(B)** Representación esquemática del cerebro de la rata, tomada de Mcdonald (162) que muestra las interconexiones de la corteza retrosplenial granular y disgranular (RSG y RSD) con campos corticales visuales secundarios medial y lateral (V2MM y V2L), postrhinales (PRh), ectorhinales (ECT) y entorhinales (ENT), que hodológicamente se comunican con el complejo gris amigdalino y sus diferentes divisiones. Abreviaturas: FR2: Corteza frontal dorsomedial; S1: Corteza somatosensorial primaria; S2: Corteza somatosensorial secundaria.

En su conjunto, la corteza retrosplenial tiene una amplia gama de conexiones que incluyen tanto áreas corticales proximales y distales como así también regiones subcorticales. Particularmente, la RSD se conecta ipsilateralmente con la corteza orbital, cg anterior, área visual primaria y secundaria (V1M, V2MM y V2L), Post y RSG (Figura 2 B), mientras que las conexiones contralaterales provienen de todos los sectores de la corteza retrosplenial. Subcorticalmente las proyecciones alcanzan el claustrum, la banda diagonal de Broca, el núcleo septal medial, los núcleos talámicos ánteromedial, láterodorsal y reuniente, el núcleo del rafe y el locus coeruleus (253). Por su parte, las conexiones directas de la RSG incluyen proyecciones contralaterales a RSG e ipsilaterales a RSD, cortezas visual y cg anterior, presubiculum, S rostroventral, Post e hipocampo. Subcorticalmente se reportan conexiones de la RSG con el claustrum, la banda diagonal de broca, los núcleos talámicos ánterodorsal, ánteroventral, láterodorsal y reuniente, el núcleo del rafe, el locus coeruleus y el núcleo ventral pontino (252, 254).

La corteza retrosplenial en humanos ha sido implicada en el procesamiento de la memoria (225, 248), la navegación espacial (268) y el estado de conciencia (257, 261). Evidencias fisiológicas y anatómicas han confirmado el rol que tiene la corteza retrosplenial en la integración de la información espacial y visual en animales (67, 99, 125, 251, 258, 280) y han resaltado su contribución al aprendizaje (36, 251, 255) y el procesamiento emocional (32, 152, 153, 154, 256). Sin embargo, es evidente que la sola disfunción de la corteza restrosplenial no es suficiente para explicar la variedad de alteraciones conductuales generadas por los A-NMDA. Esto queda evidenciado porque lesiones de la corteza retrosplenial no afectan ciertas conductas que son típicamente alteradas por los A-NMDA y que están alteradas en desordenes neuropsiquiátricos, como es el caso de la inhibición prepulso (132). Animales de experimentación o humanos sufren sobresalto tras un repentino e inesperado estímulo auditivo fuerte, sin embargo, si ese estímulo es precedido 30-500 mseg por un preestímulo apenas perceptible en similar circunstancia ese sobresalto se reduce considerablemente o desaparece por completo, lo que se denomina inhibición prepulso. El proceso inhibitorio activado por el preestímulo y la disminución del sobresalto se utiliza como una medida operacional del filtro sensoriomotor (28, 84, 85, 86, 105, 242). El tratamiento con A-NMDA evita la reducción o inhibición del sobresalto y ello se interpreta como una desregulación del filtro sensorial (18, 19, 29, 30, 85, 86). Puesto que la inhibición prepulso está también deteriorada en desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, hay considerable interés en entender las bases neuronales de esta conducta (250).

Es interesante destacar que el bloqueo de receptores NMDA a través de inyecciones “in situ” en la amígdala afecta la inhibición del prepulso en ratas (73). Más aún, la alteración de la inhibición prepulso inducida por MK801 es revertida por la co-administración sistémica de antipsicóticos como clozapina (18, 19, 101, 242), los que activan el núcleo central de la amígdala extendida (42, 206, 150, 151). Estas observaciones hacen suponer que la amígdala estaría implicada en las alteraciones conductuales inducidas por los A-NMDA. En línea con esta posibilidad se ha reportado que la amígdala se conecta directa e indirectamente con la mayoría de la estructuras afectadas por el tratamiento con los A-NMDA como las cortezas RSG, RSD, V2MM, V2L, perirhinal, PRh, S y ENT (32, 33, 34, 260). Por todo ello, es probable que las modificaciones funcionales y comportamentales inducidas por A-NMDA incluyan la disfunción del complejo amigdalino, y más específicamente la subdivisión de la amígdala extendida central. Sin embargo, esta hipótesis requiere de una confirmación experimental directa.

La amígdala

Los estudios tradicionales de la amígdala dividen a este complejo en dos grandes divisiones, la amígdala extendida y los núcleos amigdalinos corticales. En base a sus características citológicas, citoquímicas y funcionales, una revisión más reciente de este complejo gris ha establecido 4 subdivisiones: la amígdala extendida (AEX), los núcleos amigdalinos corticales superficiales, el complejo nuclear basolateral y, por último, un grupo de células no clasificadas (6, 55, 56).

Según las evidencias reunidas en el cerebro de todos los mamíferos hasta ahora estudiados, el continuo neuronal amígdalo-sublenticulo-estrial (53, 55, 60), conocido como la AEX (7), está conformado por dos divisiones principales, la AEX central y AEX medial (Figura 3 A y B), cuyos núcleos principales son el núcleo amigdalino central (Ce) y el núcleo amigdalino medial (Me), respectivamente (6, 55, 96, 97). La prolongación de estas dos estructuras está conformada de un lado, por las neuronas que acompañan a la estría terminal en su curso supracapsular, es decir, la división supracapsular del núcleo del lecho de la estría terminal (BSTS) (6, 54, 55,56, 161, 223); y del otro lado, por neuronas alineadas en columnas que transcurren en el área inmediatamente subyacente al globo pálido (o pálido dorsal) denominado amígdala extendida sublenticular, SLEA (6,56). Esta hipótesis, originalmente de naturaleza puramente morfológica y conexional,

actualmente tiene sustento fisiológico, neuroendocrinológico, electrofisiológico y comportamental (31, 39, 40, 78, 96, 97, 122, 163, 206, 222, 241). Tal como debe esperarse de cualquier estructura que constituye una unidad morfofuncional, la división medial y central de la AEX presentan una relativa homogeneidad a lo largo de su eje rostro-caudal. Sin embargo, tal disposición se halla parcialmente enmascarada por la existencia de un cierto número de subnúcleos internos más pequeños. (40, 55, 56, 60, 162, 210). La división AEX medial es un gran complejo de núcleos que por un lado se reconocen por sus relaciones hodológicas con centros hipotalámicos que regulan la función hipofisaria, núcleos viscerales del tronco encefálico y la médula espinal, y por otro lado, sus circuitos intrínsecos de conexiones asociativas (55, 210). Las estructuras que pertenecen a esta subdivisión son: la división medial del núcleo del lecho de la estría terminalis (BSTSM), el núcleo amigdalino medial (Me), amígdala medial anterodorsal (MeAD) y anteroventral (MeAD) posteroventral (MEPV) y posterodorsal (MePD), división medial del núcleo del lecho de la estría terminalis supracapsular (BSTSm) y la amígdala extendida sublenticular medial (SLEAm) (Figura 3 B). Así, el núcleo central de la AEX presenta dos divisiones bien definidas, lateral (CeL) y medial (CeM) (6, 55, 56). También conforman parte de la AEX central la división lateral del núcleo del lecho de la estría terminalis (BSTL) y la división lateral del núcleo del lecho de la estría terminalis supracapsular (BSTSl), entre otros (56, 161, 165) (Figura 3 A). A su vez la AEX central establece, entre otras, conexiones recíprocas con la parte caudal del accumbens shell y con la corteza prefrontal. Las conexiones indirectas de la corteza retrosplenial para acceder al complejo amigdalino, más particularmente, a la AEX central, tendría lugar por varias rutas que inervarían a la neocorteza de asociación visual, auditiva, gustativa y vegetativa (62, 63).

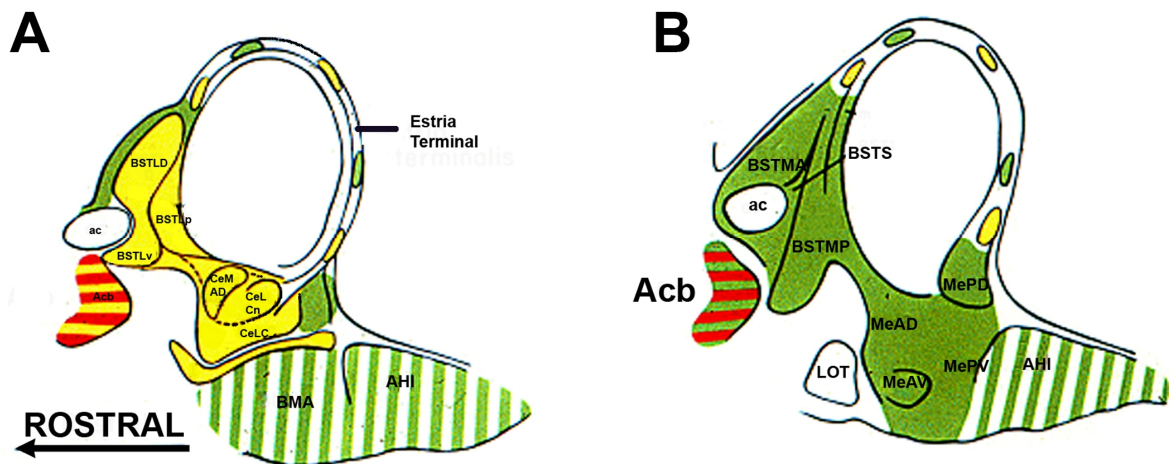


Figura 3: Representación esquemática del concepto anatómico de la amígdala extendida (AEX). En (A) se aprecia la división central de la AEX y en (B) la división medial de la AEX. Abreviaturas: ac: Comisura anterior; Acb: Núcleo accumbens, AHI: Área amígdalohipocampal; BMA: Núcleo amígdalino basomedial, división anterior; BSTLD : Núcleo del lecho de la estria terminal lateral división dorsal; BSTLp : Núcleo del lecho de la estria terminal lateral división posterior; BSTLv : Núcleo del lecho de la estria terminal lateral división ventral; BSTMA: Núcleo del lecho de la estria terminal medial división anterior; BSTMP: Núcleo del lecho de la estria terminal medial división posterior; BSTS: Núcleo del lecho de la estria terminal supracapsular; CeLCn: Núcleo amígdalino central división central; CeLC: Núcleo Amígdalino central división capsular; CeMAD: Núcleo Amígdalino central división medial antero dorsal; LOT: Núcleo del tracto olfatorio lateral; MeAD: Núcleo amígdalino medial antero dorsal; MeAV: Núcleo amígdalino medial antero ventral; MePD: Núcleo amígdalino medial posterodorsal; MePV: Núcleo amígdalino medial posteroventral. Esta figura fue tomada de: de Olmos (53).

Aparentemente, un sector de la división lateral del área visual secundaria (V2L) sería una de las fuentes principales de proyecciones occipitales directas al complejo amígdalino, específicamente a CeL de la AEX central.

El complejo nuclear amígdalino se encuentra interconectado por complejas vías de conducción organizadas topográficamente (54, 55, 56, 207, 208, 210). Estas interconexiones amígdalinas se encuentran involucradas tanto en el procesamiento de la información sensorial como también en la ejecución de procesos emocionales (142). Así, se ha podido establecer que información sensorial originada en núcleos de empalme del tronco encefálico y/o aún directamente en la médula espinal, arriban al complejo amígdalino cursando distintas vías de conducción que hacen sinapsis en distintos núcleos del complejo amígdalino (10, 54, 55, 210). Lo mismo sucede con la información sensorial que llega desde la neocorteza sensorial (54, 55, 56, 163, 210). Es a partir de esta llegada que conexiones amígdalinas intrínsecas, de naturaleza muy diversa, vienen a

desempeñar un rol crítico en el manejo de la información sensorial desembarcada a un núcleo amigdalino, dando paso de allí en adelante a ser transmitida a otros componentes grises amigdalinos y de este modo, a ser afectada o modulada por sistemas aferentes que los alcanzan desde otros sistemas funcionales del cerebro (163, 207, 208). Los impulsos sensoriales así procesados son puestos a disposición de los dos principales sistemas de salida del complejo amigdalino, es decir, las divisiones central y medial de la AEX.

Numerosas evidencias indican que AEX participa en diversas formas de comportamiento y su disfunción estaría implicada en trastornos neuropsiquiátricos relacionados con el miedo, la angustia, la agresión, o la adicción a drogas (9,13, 51, 135, 235). Particularmente interesante también resulta la asociación entre la AEX y patologías psiquiátricas como la esquizofrenia (66, 206, 239). Estudios estructurales de neuroimágenes han determinado una reducción del volumen de la amígdala en pacientes diagnosticados con esquizofrenia (5, 185). A través de estudios funcionales de neuroimágenes se ha revelado una correlación directa entre el aumento de la actividad de la amígdala y la intensidad de síntomas positivos en pacientes diagnosticados con esquizofrenia (221, 244). Considerando la similitud de ciertas conductas inducidas por los A-NMDA y la de la esquizofrenia es posible especular que estas drogas impactan en el funcionamiento de la amígdala. Sin embargo, los cambios neurotóxicos y morfofuncionales inducidos por los A-NMDA en la amígdala no han sido investigados en detalle. Por lo tanto, este trabajo de tesis ha sido diseñado para analizar de manera sistemática y detallada los cambios anatómofuncionales inducidos por MK801, un A-NMDA altamente específico, en la AEX y estructuras corticales homológicamente relacionadas.

HIPÓTESIS

La amígdala extendida y estructuras corticales relacionadas hodológicamente participarían de las alteraciones anátomo-funcionales transitorias y/o permanentes inducidas por el consumo abusivo de drogas antagonistas no competitivas del receptor NMDA, tales como MK801, PCP y ketamina.

OBJETIVO GENERAL

Analizar en la rata la relación entre la neurotoxicidad y los cambios morfofuncionales en la amígdala extendida y áreas corticales del sistema nervioso central sensibles a los efectos del antagonista no competitivo del receptor NMDA, MK801.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los estudios específicos de los efectos neurotóxicos de los A-NMDA se han realizado fundamentalmente en la rata hembra. Sobre la base de nuestros trabajos previos y de la literatura publicada sobre el efecto dimórfico de la neurotoxicidad inducida por los A-NMDA, se decidió analizar la influencia del sexo y las hormonas gonadales sobre la neurodegeneración revelada, ya que no hay precedentes que hayan esclarecido este punto. Por otro lado, el estudio de otros laboratorios sobre los cambios en la expresión de los GET inducidos por los A-NMDA fueron realizadas en dosis sub-toxicas que no revelan neurodegeneración. A su vez, la caracterización de las neuronas involucradas en el proceso neurotóxico inducido por los A-NMDA no se ha realizado previamente, por lo tanto, la posibilidad de identificar las poblaciones neuronales afectadas por el efecto neurotóxico podría dar luz a nuevos mecanismos de acción de estas drogas. Es por ello, que el desarrollo experimental presentado en este trabajo se planteó de manera que integrase distintos niveles de conocimiento del efecto neurotóxico del A-NMDA, MK801, para construir una hipótesis de las posibles relaciones hodológicas que participan en los efectos neurotóxicos de los A-NMDA. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Caracterizar la influencia del sexo y las hormonas gonadales sobre la neurodegeneración inducida por MK801:

ANÁLISIS NEUROANATÓMICO DE LA DEGENERACIÓN NEURONAL INDUCIDA POR MK801

1.1.- Efectos sexualmente dimórficos e influencia de las hormonas gonadales en la degeneración neuronal inducida por MK801 en la corteza retrosplenial granular de la rata.

1.2.- Determinación de la dosis y sobrevida de la degeneración neuronal inducida por MK801 en ratas macho enteras y orquiectomizadas.

- 2) Caracterizar anátomo-funcionalmente los efectos neurotóxicos inducidos por MK801 a través del estudio de marcadores de neurodegeneración y de la inducción de proteínas codificadas por los genes de expresión temprana:

ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS MORFOFUNCIONALES INDUCIDOS POR EL EFECTO NEUROTÓXICO DE MK801:

Estudio de la inducción de proteínas codificadas por los genes de expresión temprana: c-Fos, FosB y EGR-1.

- 3) Caracterizar fenotípicamente las poblaciones neuronales blanco del efecto tóxico de MK801:

ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS INDUCIDOS POR EL EFECTO NEUROTÓXICO DE MK801

Determinación de subpoblaciones de neuronas que contienen proteínas fijadoras de calcio: Calretinina y Parvalbúmina.

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

1) ANÁLISIS NEUROANATÓMICO DE LA DEGENERACIÓN NEURONAL INDUCIDA POR MK801

1.1 Efectos sexualmente dimórficos e influencia de las hormonas gonadales en la degeneración neuronal inducida por MK801 en la corteza retrosplenial granular de la rata

Previamente, ha sido establecido que el efecto neurotóxico del MK801 es mayor en ratas hembras que en machos. En este estudio nuestro objetivo estuvo dirigido a determinar:

- 1) Si los niveles circulantes de las hormonas gonadales en ratas de ambos sexos proveían algún grado de protección o sensibilización contra la injuria neuronal inducida por MK801. Para poder realizar este análisis, se gonadectomizaron ratas de ambos sexos, y luego del tratamiento con MK801, se comparó la neurodegeneración inducida entre las diferentes condiciones.
- 2) Si las diferencias sexuales dependían de los niveles circulantes de los estrógenos o si los andrógenos también jugaban un rol en la expresión de la neurodegeneración. Para ello se administraron hormonas en animales de ambos sexos, enteros y gonadectomizados, y tras aplicar MK801 se analizó la neurodegeneración inducida.

Trabajos previos de nuestro y de otros laboratorios han determinado que la corteza retrosplenial (RSC) de la rata es el área del SNC más sensible a los efectos neurotóxicos del MK801. Resultados de esta tesis demostraron más específicamente que la degeneración de somas argirofílicas se localizaban en división granular dentro de la corteza retrosplenial (RSG). Por lo tanto, para determinar los efectos neurotóxicos en relación a las hormonas gonadales, se analizó la expresión de la neurodegeneración dentro de la RSG.

Animales:

Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos del Bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC) de 69-80 días de edad (215 a 350 g). Los animales fueron mantenidos en el bioterio con temperatura controlada (20-22°C), ciclo de luz –oscuridad de 12 horas, y con libre acceso a comida y agua.

Tratamiento

Tabla 1. Tratamiento de los animales para el análisis de la neurotoxicidad inducida por MK801 (5mg/kg) en RSG. Los animales fueron separados en 16 grupos (n = 4-7)

Macho	Intacto	Vehículo	CINa
Macho	Intacto	Vehículo	MK801
Macho	Intacto	Estrógeno	MK801
Macho	Intacto	Testosterona	MK801
Macho	Intacto	Dehidrotestosterona	MK801
Macho	Orquiectomizado	Vehículo	CINa
Macho	Orquiectomizado	Vehículo	MK801
Macho	Orquiectomizado	Estrógeno	MK801
Macho	Orquiectomizado	Testosterona	MK801
Macho	Orquiectomizado	Dehidrotestosterona	MK801
Hembra	Intacta	Vehículo	CINa
Hembra	Intacta	Vehículo	MK801
Hembra	Intacta	Estrógeno	MK801
Hembra	Intacta	Testosterona	MK801
Hembra	Intacta	Dehidrotestosterona	MK801
Hembra	Ovariectamizada	Vehículo	CINa
Hembra	Ovariectamizada	Vehículo	MK801
Hembra	Ovariectamizada	Estrógeno	MK801
Hembra	Ovariectamizada	Testosterona	MK801
Hembra	Ovariectamizada	Dehidrotestosterona	MK801

Drogas:

-MK801: Maleato de dizocilpina, 5 mg/kg (+ 5-Methyl -10, 11-dihydro - 5H-dibenzo [a, d] cyclohepten -5, 10-imine hydrogen maleate, RBI cat no. M-107) diluidos en cloruro de sodio (CINa) 0,9%.

-Propionato de Testosterona: 100 mg/10 mL de aceite neutro (Organon S.A.).

-Benzoato de estradiol (estrógeno): 0,2 mL en 9,8 mL de aceite neutro (Progynon B de Schering Argentina S.A.I.C).

-Dehidrotestosterona: 100 mg/mL de aceite neutro (Sigma).

La dosis de 5 mg/kg de MK801 es corrientemente utilizada para estudiar la neurotoxicidad irreversible en ratas hembras adultas, provocando un bajo índice de

mortandad (111, 276). Las dosis de las hormonas fueron seleccionadas en base a las indicaciones del prospecto del fabricante y de trabajos previos en donde restauraban el nivel hormonal del animal gonadectomizado para diferentes estudios (49, 62, 139).

Gonadectomía y reposición de hormonas

Hembras y machos fueron ovariectomizadas u orquiectomizados bilateralmente a los 45 días de edad bajo anestesia con hidrato de cloral 6% (0,5 mL cada 100 g de peso corporal). A los 21 días de la cirugía, los animales recibieron tres inyecciones (una cada 24 horas) de las siguientes hormonas o vehículo:

- aceite neutro (vh): 0,2 mL
- benzoato de estradiol en aceite neutro (EB): 0,1 mg/kg
- propionato de testosterona en aceite neutro (TP): 2 mg/kg
- dehidrotestosterona en aceite neutro (DHT): 5 mg/kg

Otros grupos de animales de ambos sexos en condición de enteros (65-76 días), a los que no se les había practicado cirugía alguna, también recibieron tratamiento de vehículo u hormona durante tres días. Luego de 24 hs de la última dosis de hormona o vehículo, a todos los grupos se les administró una inyección i.p. de ClNa 0,9% (salina) o 5 mg/kg de dizocilpina (MK801). A las 72 hs de la última inyección de ClNa o MK801 se sacrificaron los animales para luego ser analizados.

Sacrificio y obtención del material histológico

Se siguieron las normas establecidas para la fijación de animales de experimentación (27) con pequeñas variaciones para adaptarlas a las técnicas de tinción. Cumplido el tiempo indicado de sobrevida, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.) y perfundidos intracardiácamente pasando las siguientes soluciones con una bomba de perfusión: 150 mL de solución lavadora (Glucosa 0,4 %, Sucrosa 0,8 % y Cloruro de sodio 0,8 %) seguido de 300 mL de paraformaldehído al 4% en buffer Borato 0,2 M pH = 7,6. Posteriormente los cerebros permanecieron 12 hs en el cráneo y luego fueron removidos y colocados en sucrosa al 30% por 48-72 hs. A continuación, los cerebros fueron cortados utilizando un micrótopo de congelación, en forma sagital a 40 µm de espesor y recolectados en 5 series de secciones para separar cortes destinados a diferentes técnicas. Los cortes reservados para la técnica aminocupro-argéntica fueron almacenados en fijador, mientras que los cortes destinados a la

aplicación de las técnicas de Fluoro Jade B e inmunohistoquímica se almacenaron en buffer fosfato salino (PBS 0,01 M pH 7,4).

Técnica amino-cupro-argéntica (A-Cu-Ag) para la detección de neurotoxicidad:

El protocolo se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos por de Olmos y col. (57). Este método fue seleccionado principalmente por haber demostrado ser el más sensible para detectar la degeneración neuronal frente a una injuria neurotóxica y además, por tener la particularidad de impregnar a las estructuras degeneradas de una manera más intensa, sin producir tinciones de fondo, facilitando de esa manera, el conteo de células degeneradas (57, 75, 276).

El procedimiento comenzó con la preparación de una 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	1,0 mL
Trietanolamina	1,0 mL
Isopropanol	2,0 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. A la mañana siguiente los cortes almacenados en fijador se lavaron con agua deionizada (dos lavados de 30 segundos) y luego se colocaron en la solución preimpregnadora. Posteriormente se calentó la mezcla con los cortes en constante agitación en el horno microondas hasta alcanzar los 50°C.

Después de que la mezcla regresó a temperatura ambiente (2 horas aproximadamente) los cortes fueron sometidos a un lavado con agua deionizada y dos lavados con acetona (cada lavado de 30 segundos). Luego los cortes se pasaron a una solución impregnadora, preparada de la siguiente manera:

Nitrato de plata	412 mg
Agua bidestilada	5,00 mL
Etanol 100%	4,00 mL
Acetona	0,05 mL
Hidroxido de litio 0,4%	3,00 mL
Amoníaco	0,65 mL

Aquí fueron mantenidos en agitación constante durante 50 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se transfirieron a una solución reductora donde permanecieron otros 25 min:

Formalina 10%	11 mL
Acido Cítrico 1%	6,3 mL
Etanol 100%	90 mL
Agua bidestilada	800 mL

Después los cortes fueron sometidos a un lavado con agua deionizada, a un lavado con ácido acético y dos más con agua deionizada (1 min. cada lavado).

Para la decoloración, los cortes fueron sometidos al blanqueo en una solución de ferricianuro de potasio al 0,4% (3 minutos) y en otra de permanganato de potasio al 0,06% (30 segundos), intercalando éstos con lavados de agua destilada. Finalmente los cortes pasaron por soluciones estabilizadoras de tiosulfato de sodio al 2% y en fijador rápido diluido 1/6, quedando en agua deionizada durante no más de 24 horas, tras lo cual los mismos se montaron sobre portaobjetos. Una vez deshidratados fueron cubiertos con medio de montaje (Permount o DPX).

Protocolo de Fluoro Jade B para la detección de neurotoxicidad

Otro método que se utilizó para evaluar la neurotoxicidad inducida por MK801 fue la técnica de fluorescencia recientemente desarrollada como indicador de degeneración neuronal, Fluoro-Jade B (FJB) (220):

- 5 min. en hidróxido de sodio 1 % + alcohol etílico 80 %
- 2 min. en alcohol 70 %
- 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 %
- 1 min. en agua destilada
- 1 min. en agua destilada
- 1 min. en agua destilada
- secado en la plancha a 50°C (10-20 min.)
- 1 min. (al menos) en xileno
- Cubrir con DPX.

Solución de trabajo de Fluoro Jade B:

- solución madre de FJB 0,01 %
- 4 mL de solución madre de FJB + 96 mL ácido acético 0,1 %

Análisis de imágenes y cuantificación

La neurodegeneración se analizó dentro de la capa IV de la corteza retrosplenial granular (RSG). En un estudio previo (16) se demostró que los cambios neuropatológicos inducidos por MK801 en la RSG de la rata se incrementaban en un sentido rostro-caudal con un pico entre $-5,3$ y $-7,3$ mm respecto al bregma. Por lo tanto, se consideró que cortes sagitales serían óptimos al revelar la extensión de la degeneración inducida por MK-801 dentro de la RSG. Somas argirofílicas revelados por la técnica A-Cu-AG se cuantificaron con un aumento de 50X. A esta magnificación, una coloración intensa de los cuerpos celulares, axones y dendritas de las neuronas degenerativas eran fácilmente identificados y cuantificados. El promedio de células neurodegenerativas en la RSG de cada animal se obtuvo por el conteo del número de neuronas argirofílicas en ambos hemisferios de tres cortes correspondientes a los planos laterales 0,9 ; 1,1 y 1,4 mm de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (198). El promedio de neuronas degenerativas por animal se utilizó posteriormente para el análisis estadístico.

Análisis estadístico de los resultados

Los animales tratados con ClNa no mostraron degeneración en ningún caso, por lo tanto, las comparaciones se realizaron sólo entre los casos tratados con MK801 exclusivamente. Las comparaciones estadísticas se realizaron con el promedio del número de neuronas degeneradas por animal y se analizaron mediante un ANOVA de una

o dos vías seguido de un test post hoc de Newman-Keuls. Se considera que un valor de $p < 0.05$ representa diferencia estadísticamente significativa.

1.2 Determinación de la degeneración neuronal inducida por MK801 en ratas machos enteras y orquiectomizadas

Comúnmente se utilizaba la rata hembra para estudiar los efectos neurotóxicos del MK801. Debido a que el macho ORQ presentaba una sensibilidad similar a la de la hembra, los siguientes experimentos se realizaron para:

- 1) Establecer la dosis de MK801 en donde el cuadro de la neurotoxicidad irreversible era reproducible de manera sistemática tanto en los machos enteros como en los ORQ. Nuevamente se seleccionó la RSG para el análisis de este punto.
- 2) Determinar la sobrevida en donde la expresión de la neurodegeneración era mayor, tanto en machos enteros como en ORQ, a través del cuadro neuropatológico inducida por la dosis neurotóxica seleccionada de MK801 en diferentes estructuras del SNC.

Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho enteras y orquiectomizadas del bioterio del INIMEC de 75-80 días de edad (300 a 350 g). Se realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente para la orquiectomía.

Determinación de dosis neurotóxica

Se analizaron los efectos neurodegenerativos a diferentes dosis en la RSG utilizando ratas macho enteras y ORQ

Tratamiento: 5 mg/kg (n= 4-5 machos enteros y ORQ), 10 mg/kg (n= 4-5 machos enteros y ORQ) y 15 mg/kg (n= 2 machos enteros y ORQ) de MK801.

Posteriormente, se realizó una determinación de la neurodegeneración en RSG, analizando los siguientes planos de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2007).

Frontales: 1,8 mm; 2,8 mm; 3,8 mm; 4,8 mm; 5,3 mm; 6,3 mm; 7,3 mm

Laterales: 0,9mm, 1,1mm and 1,4 mm

A las 72 horas de la inyección de MK801, se sacrificaron los animales para luego ser analizados. El sacrificio y la obtención del material histológico se realizó de la misma manera que se describió anteriormente.

Determinación de la sobrevida

Se analizaron los efectos neurodegenerativos de 10 mg/kg de MK801 a diferentes tiempos de sobrevida utilizando ratas macho enteras y ORQ:

Sobrevida: 24 hs (n=2), 48 hs (n=2), 72 hs (n=2), y 120 hs (n=2).

Para analizar la neurodegeneración se utilizaron las técnicas de A-Cu-Ag y FJB en cortes sagitales y frontales. Posteriormente se realizó una determinación cualitativa de la neurodegeneración en diferentes áreas del cerebro utilizando las coordenadas y nomenclatura de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2007).

2 y 3 Estudio de los cambios morfofuncionales y fenotípicos inducidos por el efecto neurotóxico de MK801

El MK801 podría estar relacionado, vía desinhibición, a sobre-estimulación de neuronas pos-sinápticas, provocando diferentes tipos de cambios en el cerebro. Los genes de expresión temprana (GET) expresan proteínas que están activadas en el cerebro como respuesta a varios estímulos, tales como la injuria y el tratamiento con drogas. La inducción de los GET es utilizada como una herramienta de mapeo anatómico funcional para identificar células y circuitos que se activan a través de la respuesta a diversos estímulos. También son indicadores de mecanismos de plasticidad neuronal y cambios adaptativos que estarían asociados a diversas condiciones, entre ellas, neurotoxicidad.

A su vez, la sobre-estimulación de las neuronas podría deberse a que neuronas GABAérgicas inhibitorias estuvieran afectadas por el MK801. Una manera de identificar las poblaciones de neuronas GABAérgicas es a través de las proteínas ligadas al Ca^{+2} (CaBP). Los siguientes experimentos se realizaron para determinar:

- 1) Si la dosis neurotóxica de MK801 inducía cambios de la expresión de proteínas de los GETs c-Fos, FosB y EGR-1, como respuesta a la neurodegeneración. Para ello se analizó la expresión de la inmunorreactividad a las proteínas c-Fos, FosB y EGR-1 en áreas de la corteza y de la amígdala extendida (AEX) en ratas macho enteras y ORQ.
- 2) Si la población neuronal sensible a los cambios neurotóxicos y/o en la expresión de GETs que induce el MK801 presenta cambios en la expresión de las CaBP, las cuales colocalizan dentro de subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas. Para ello se analizó la expresión de la inmunorreactividad de las CaBP, calretinina y parvalbúmina en áreas de la corteza y de la AEX en ratas macho enteras y ORQ.

Posteriormente se vinculó la expresión entre los diferentes GETs, CaBP y la neurodegeneración revelada con A-Cu-Ag en las estructuras donde se reveló un cambio significativo en la expresión de los GET.

El siguiente diseño experimental se utilizó el para desarrollo de los objetivos 2 y 3.

Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho enteras y ORQ del bioterio del INIMEC de 75-80 días de edad (315 a 350 g). Se realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente para la orquiectomía.

Tratamiento

Para la evaluación del efecto neurotóxico de MK801 sobre la expresión de diferentes proteínas marcadoras de los GETs y las CaBP, se trataron diferentes grupos de ratas macho enteras y ORQ:

- a) Experimentales: una dosis aguda i.p. de MK801 (10 mg/kg) (dilución 6 mg/mL en cloruro de sodio al 0,9%)
- b) Controles: una administración i.p. de ClNa 0,9%.

Determinación de la expresión de c-Fos

Los animales se sacrificaron después de diferentes tiempos de sobrevida establecidos en: 3 hs (n=2), 8 hs (n=2), 12 hs (n=2), 24 hs (n=2), 48 hs (n=2), 72 hs (n=4) y 120 hs (n=4) posteriores a la inyección de MK-801. Paralelamente se procesaron los controles de la misma forma. El sacrificio y la obtención del material es el mismo mencionado anteriormente.

Determinación de la expresión de FosB, EGR-1 y CaBP

Los animales controles (n=8) y experimentales se sacrificaron 72 horas post-tratamiento de manera tal que se compara la neurodegeneración con los cambios de expresión de estas proteínas inducidos por MK801 en ratas macho enteras (n=4) y ORQ (n=4).

Técnica de Inmunohistoquímica

La detección de la expresión de las proteínas de los GETs y CaBP se realizó aplicando técnicas inmunohistoquímicas y se utilizaron las series de cortes que se conservaron en PBS 0,01M.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

-3 lavados por 0,01M PBS

- incubación de los cortes 1 hora en: metanol/ agua oxigenada/ PBS 0.01M en una relación 1/1/8 para inhibir la peroxidasa endógena del tejido.
- 3 lavados por 0,01M PBS
- incubación por 1 hora en 5% suero normal (5% SN) para bloquear uniones inespecíficas.
- incubación en el anticuerpo primario (AC-1°) diluido en 1% SN por 48 hs a 4°C en agitación.
- 3 lavados por 0,01M PBS
- incubación en el anticuerpo secundario (AC-2°) diluido en 1% SN por 3 horas.
- 3 lavados por 0,01M PBS
- incubación en el complejo Avidina- Biotina (ABC) (Vectastain ABC kit, Vector Lab, CA, USA)
- 3 lavados por 0,01M PBS
- revelado con 0,05% tetrahidrocuro de diaminobenzidina (DAB) (Sigma) y 0,005% agua oxigenada disuelto en 0,01M PB.
- Luego de revelar, los cortes fueron montados y cubiertos con DPX.

Técnica de doble marca con DAB marrón y negro:

Para relacionar la expresión de FosB y las CaBP, parvalbumina (PV) y calretinina (CR), se hizo una doble inmunohistoquímica, realizando primero el anticuerpo de las CaBP en DAB marrón y luego de revelar, nuevamente se bloquearon con SN 5% por 1 hora y se realizó todo el protocolo de inmunohistoquímica para el FosB en DAB negro.

DAB negro

Fostato buffer pH = 7,4;	0,1 M
Tetrahidrocuro de diaminobenzidina (DAB)	0,05 %
Cloruro de cobalto	0,01 %
Cloruro de níquel	0,01 %
Agua oxigenada	0,005 %

Doble marca de A-Cu-Ag e Inmunohistoquímica

Para determinar la relación de neurotoxicidad y expresión de la inmunorreactividad a FosB, CR y PV, se realizó primero la técnica A-Cu-Ag y luego la técnica de inmunohistoquímica con todos los pasos mencionados anteriormente.

Triple marca con Fluoro jade B, inmunofluorescencia y Hoechst

Los cortes fueron montados en agua bidestilada y luego secados a temperatura ambiente. Se realizó primero el protocolo del FJB tal como se describió anteriormente y luego se realizó la técnica inmunohistoquímica. El procedimiento que se llevó a cabo es similar al anterior: bloqueo con 5% SN por una hora, incubación de los cortes en AC-1° a temperatura ambiente por 24 hs, se lavan 3 veces con PBS 0.01 M y luego se incubaron en AC-2° por 2 horas. Para el revelado de PV o CR se utilizó directamente un anticuerpo secundario marcado con un fluorescente rojo (rodamina). Posteriormente se los incubó 5 min. en una solución de Hoechst al 0,005% y luego de lavar 3 veces en PBS, los cortes fueron cubiertos, en este caso con FluoroSave (Calbiochem), para luego ser observados con su correspondiente filtro en el microscopio Fluorescente Zeiss.

Anticuerpos destinados a la detección de las proteínas:

Anticuerpos primarios:

c-Fos (1:1000, policlonal, sc-52 de Santa Cruz),
Fos B (1:2000, policlonal, sc-48 de Santa Cruz),
EGR-1 (1:1000 policlonal, sc-110 de Santa Cruz)
Parvalbumina (1:1000 monoclonal, p-3088 de Sigma)
Calretinina (1:2000 monoclonal, c-7479 de Sigma).

Anticuerpos secundarios:

-Secundario biotinilado hecho en burro contra inmunoglobulina G de conejo (1:200 Jackson Inmuno Research)
-Secundario biotinilado hecho en burro contra inmunoglobulina G de ratón (1:200 Jackson Inmuno Research)
-Secundario Alexa Fluor 568 de cabra contra inmunoglobulina G de ratón (1:200 Molecular Probes)

Cuantificación

Las células inmunorreactivas a las proteínas c-Fos, FosB, EGR-1, PV y CR se visualizaron a través del microscopio Axioplan 35M (Zeiss), provisto de óptica de fluorita para campo claro. Las imágenes de las diferentes estructuras se tomaron con una video camara Leica DC200 y una vez obtenidas, se enviaron al editor de imágenes Adobe Photoshop 7.0. De allí se almacenaron en una computadora IBM compatible y posteriormente se realizó la cuantificación con el programa para el análisis de imágenes

SCION (NIH). Los núcleos c-Fos, FosB y EGR-1 positivos se contabilizaron sólo cuando presentaron una estructura apropiada en tamaño y forma, con un incremento significativo en la inmunorreactividad al ser comparadas con el “fondo”. Las células PV y CR positivas expresaban una inmunomarca citoplasmática que revelaba la forma de la neurona con sus fibras prolongadas y prácticamente nada de background. Se utilizó el atlas de Paxinos y Watson (198) y las nomenclaturas del mismo para describir la expresión de la marca inmunohistoquímica de las estructuras de interés.

Dentro de la AEX se analizaron los siguientes núcleos: amígdala medial (Me), 3 cortes: lateral 3,7 mm, 3,50mm y 3,30 mm; amígdala medial posteroventral (MEPV), 2 cortes: 3,10 mm y 2,90 mm; núcleo del lecho de la estría terminal medial (BSTM), 2 cortes: lateral 1,55 mm y 1,40 mm; núcleo del lecho de la estría terminal supracapsular (BSTS) 3 cortes 1,90 mm, 2,10 mm y 2,40 mm; núcleo del lecho de la estría terminal lateral (BSTL) 2 cortes: lateral 1,55 mm y 1,40 mm; núcleo central área lateral (CeL) 2 cortes lateral 4,30 mm y 4,20 mm; núcleo central área medial (CeM) 2 cortes lateral 3,90 mm y 3,70 mm. De las estructuras corticales sensibles a los efectos neurodegenerativos del MK801 reveladas por la técnica A-Cu-Ag se seleccionaron: corteza retrosplenial granular (RSG), corteza retrosplenial disgranular (RSD) y corteza visual secundaria mediomedial (V2MM) donde se analizaron 4 cortes: lateral 0,90 mm, 1,13 mm, 1,40 mm y 1,55 mm; y luego la corteza visual secundaria lateral (V2L) y corteza entorhinal (ENT) en donde se analizaron 3 cortes: lateral 4,20 mm, 4,32 mm, 4,50 mm (Figura 4).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio del número de núcleos positivos obtenidos a partir del análisis de los hemisferios izquierdo y derecho en los diferentes cortes cerebrales de cada estructura. De esta forma se genera un único valor de núcleos positivos por región (176). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de 2 vías (tratamiento por área) seguido de un test *post hoc* (Newman Keuls). Se considera que un valor de $p < 0,05$ representa diferencia estadísticamente significativa.

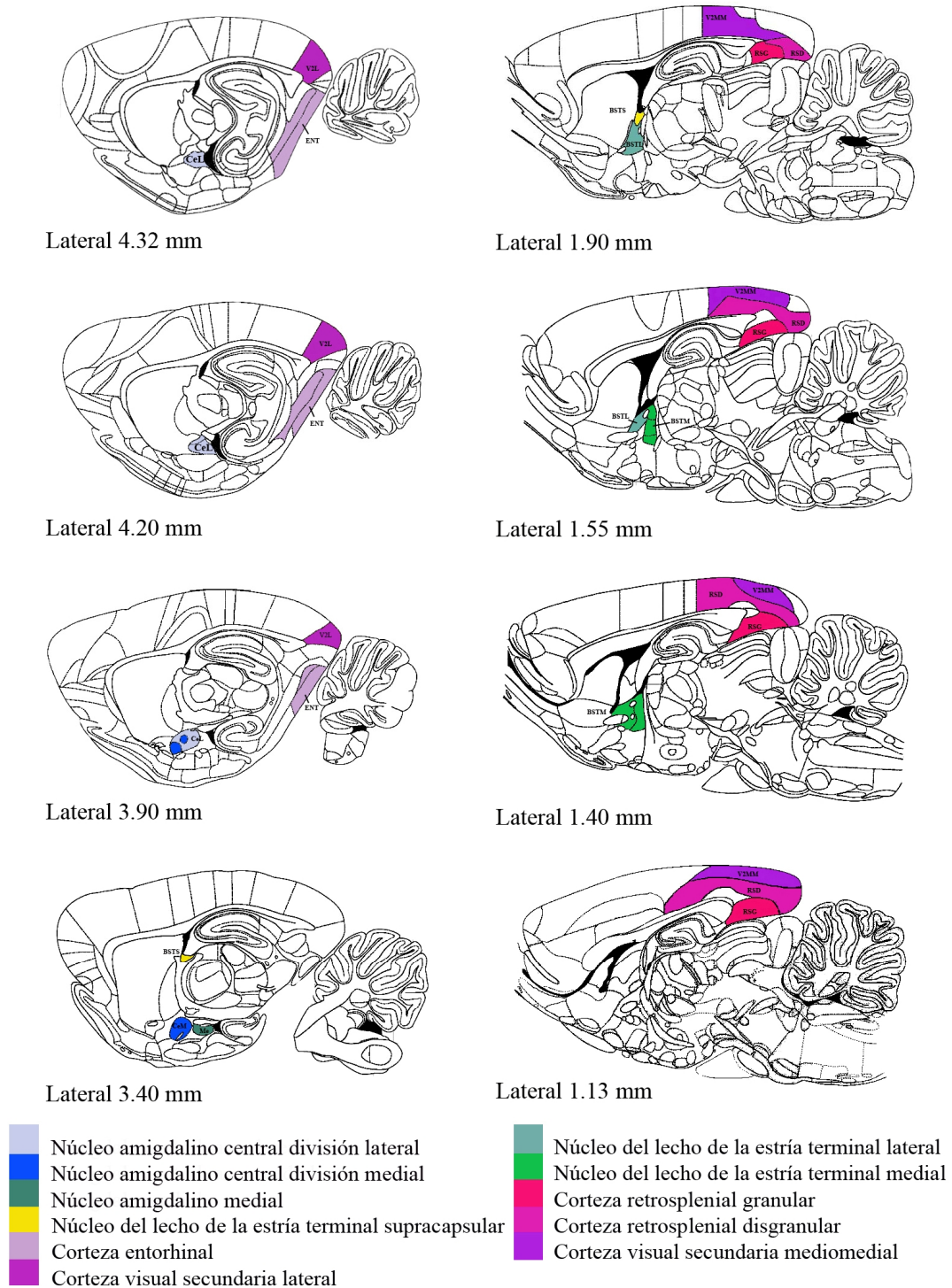


Figura 4: Representación esquemática de cortes sagitales del cerebro de la rata mostrando la localización de las diferentes áreas cuantificadas. Las imágenes fueron tomadas del atlas de Paxinos y Watson (198). La llave de colores indica la estructura específica cuantificada. Abreviaturas: CeL: Núcleo amigdalino central, área lateral; CeM: Núcleo amigdalino central, área medial; Me: Núcleo amígdalino medial; BSTS: Núcleo del lecho de la estría terminal supracapsular; BSTL: Núcleo del lecho de la estría terminal lateral; BSTM: Núcleo del lecho de la estría terminal medial; ENT: Corteza entorhinal; RSG: Corteza retrosplenial granular; RSD: Corteza retrosplenial disgranular; V2L: Corteza visual secundaria lateral, V2MM: Corteza visual secundaria mediomedial.

TÉCNICAS ADICIONALES DE CITOARQUITECTURA

Para poder analizar las diferentes poblaciones neuronales afectadas por la neurotoxicidad inducida por MK801, se realizaron técnicas histológicas anexas para estudiar con mayor precisión las áreas cuantificadas y las características que éstas presentan.

Técnica de Nissl

La técnica de Nissl permite colorear toda la población neuronal y es comúnmente utilizada para reconocer estructuras del SNC. Este procedimiento puede llevarse a cabo en cortes montados sin teñir y también en cortes procesados con las técnicas de A-Cu-Ag o inmunohistoquímica.

Solución colorante

Violeta de cresilo	0,5 g
Agua destilada	100 mL
Acido Acético	0,25 mL

Procedimiento:

Serie de alcoholes de hidratación

Incubación en solución de violeta de cresilo por 10 minutos

Lavados con agua destilada

Serie de alcoholes para la deshidratación

2 veces por xileno

Cubrir con DPX

Resultado

Substancia de Nissl : Violeta o azul oscuro

Neuronas y nucleo celular: Violeta/azul

Técnica de Timm-Danscher para metales pesados

Ciertas neuronas han desarrollado mecanismos en donde acumulan zinc en compartimentos específicos (zinc vesicular), que a su vez pueden ser revelados utilizando técnicas histoquímicas. El método de Timm-Danscher colorea esencialmente vesículas presinápticas de neuronas que contienen zinc y esto se ha confirmado por otros autores utilizando el marcador fluorescente de zinc (TSQ) (77). De esta forma se caracterizan áreas de interés del cerebro que contienen poblaciones específicas de neuronas positivas al zinc.

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo de fijación de Danscher (50) y luego de obtener los cortes de cerebro de 30 μm seccionados en el criostato, los mismos fueron procesados en una solución conteniendo:

Goma arábica 50%	120 mL
Buffer citrato pH 4,6	30 mL
Hidroquinona 5M	30 mL
Lactato de Plata 0,73%	30 mL

Los cortes se mantuvieron en oscuridad y bajo agitación constante en baño maría a 26°C durante 1 hora, luego las secciones fueron lavadas con agua destilada 3 veces y luego deshidratadas y cubiertas con DPX.

La presencia del metal en la célula actúa como punto de concentración en donde los iones de plata precipitan para formar un producto de reacción de color negro.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS

1) ANÁLISIS NEUROANATÓMICO DE LA DEGENERACIÓN NEURONAL INDUCIDA POR MK801

1.1 Efectos sexualmente dimórficos e influencia de las hormonas gonadales en la degeneración neuronal inducida por MK801 en la corteza retrosplenial granular de la rata

Estudios previos han demostrado que el MK801 induce cambios neurodegenerativos en el SNC siendo la corteza retrosplenial una de las áreas más sensibles a estos efectos (33). Además, se han reportado diferencias sexuales frente a la acción de los A-NMDA, pero sólo se han limitado a señalar que las hembras son más sensibles que los machos (12, 16, 34, 49, 76, 108, 112, 266, 276). Es notable que la contribución de los esteroides gonadales frente a la sensibilidad neuronal al MK801 no ha sido estudiada.

Para determinar la influencia de las hormonas gonadales en la degeneración inducida por MK801, se utilizaron ratas de ambos sexos enteras, orquiectomizadas (ORQ) u ovariectomizadas (OVX), tratadas con una sola inyección i.p. de solución salina (CINa 0,9%, control) ó de MK801 (5 mg/kg). Esta dosis de MK801 es corrientemente utilizada para estudiar la neurotoxicidad irreversible en ratas hembras adultas, provocando un bajo índice de mortandad (76, 111, 276). Todos los animales tratados con MK801 presentaron incoordinación, ataxia, balanceo de la cabeza y, minutos después, conducta de relajación horizontal. Entre 6 hs (machos) y 24 hs (hembras) después de la inyección de MK801 todos los animales se recuperaron. Tres días postratamiento los animales fueron sacrificados y la neurodegeneración fue evaluada en la corteza retrosplenial granular (RSG) utilizando la técnica A-Cu-Ag. Independientemente del sexo (tanto enteros, como ORQ u OVX), ninguno de los animales tratados con solución salina (controles) mostró signo alguno de neurodegeneración en RSG, ni en ninguna otra estructura del cerebro. Por lo tanto fueron excluidos de los posteriores análisis comparativos. A diferencia de los animales controles, las hembras tratadas con MK801 revelaron una reacción argirofílica robusta e intensa, tanto en los cuerpos neuronales, como en axones y dendritas. El perfil neurodegenerativo no se distribuyó uniformemente en toda la RSG sino con un claro gradiente incrementando en sentido rostrocaudal (1,8-7,3 del Bregma) (Figura 5 A), y láteromedial (0,1-1,55mm). Somas argirofílicos se detectaron exclusivamente en la capa IV, mientras que dendritas, axones y terminales se

observaban en las capas I, IV y V (Figura 5 B). Las capas II-III, aunque libres de degeneración argirofílica, ocasionalmente fueron atravesadas por fibras de paso largas, a veces puntiformes, y orientadas perpendicularmente a la parte basal de la superficie de RSG (Figura 5 A y B). Estas fibras, en la capa I, contribuían a formar acopios, en forma de manojos de dendritas degeneradas (fragmentos gruesos), intercalados con una nube menos densa de degeneración axonal (puntos más finos) (Figura 5 A y B). Se evidenció una correlación entre la cantidad de somas argirofílicas de la capa IV y la densidad de dendritas y terminales degeneradas en los segmentos correspondientes de las capas I, IV y V, sugiriendo que el conjunto forma parte de las mismas neuronas cuyos somas localizan en la capa IV.

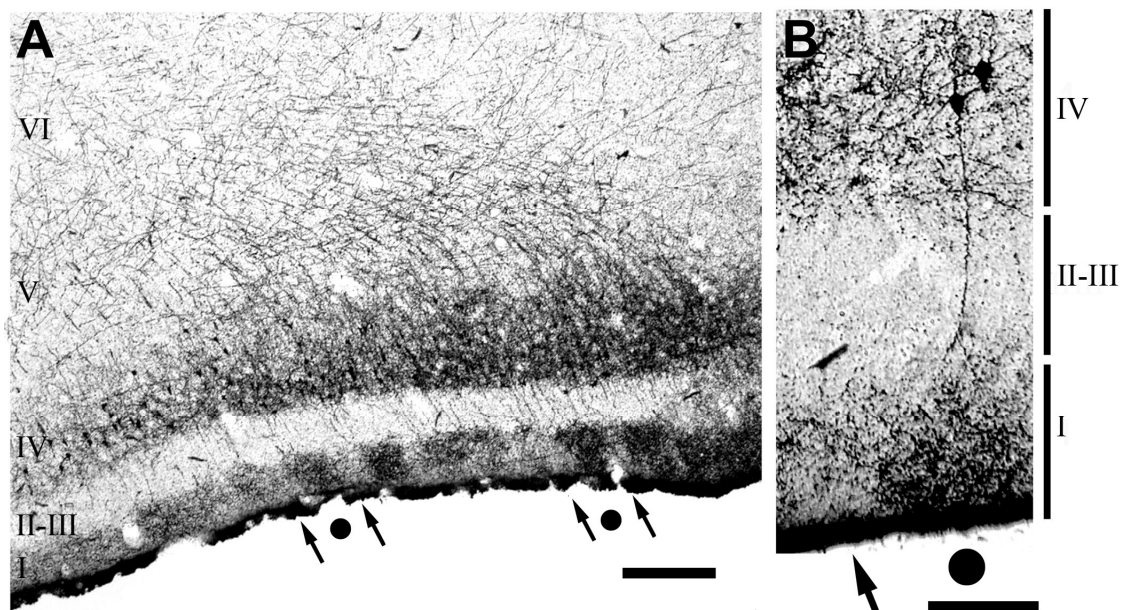


Figura 5: Neurodegeneración inducida en la RSG. **(A)** Microfotografía de bajo aumento de la degeneración neuronal revelada por la técnica amino cupro argéntica (A-Cu-Ag). En la imagen se observa un corte sagital (lat. 1,4 mm) de una rata hembra entera tratada con una sola dosis i.p. de 5 mg/kg de MK801 y analizada 3 días postratamiento. Se destaca el gradiente rostrocaudal de la degeneración neuronal y terminal. Los números romanos (I-VI) indican las capas corticales, los círculos negros destacan los acopios de dendritas degeneradas (fragmentos gruesos), intercalados con una nube menos densa de degeneración axonal (puntos más finos) señalada por las flechas, en la capa I. (escala de barra: 100 μ m). **(B)** Detalle del perfil de la neurodegeneración que se revela en RSG. Microfotografía de alto aumento de RSG (lat. 1,4 mm). Se destacan las capas II-III prácticamente libres de degeneración, salvo por algunas fibras de las neuronas de la capa IV que cruzan hacia la capa I. La capa IV revela degeneración neuronal somatodendrítica y gránulos argirofílicos que corresponden a la degeneración de terminales y dendritas. La capa I muestra los depósitos densos de plata (círculo negro) intercalados con gránulos mas finos que aparentan ser axónicos (flecha). Los números a la derecha corresponden a la capa cortical (escala de barra: 50 μ m).

Notablemente, a diferencia de lo observado en la hembra, la degeneración en los machos enteros tratados con MK801 fue casi imperceptible, evidenciando un claro patrón de dimorfismo sexual. Un mínimo grado de neurodegeneración pudo detectarse en RSG donde esporádicamente se evidenciaron somas argirofílicas confinados generalmente a la parte caudal de la RSG en la capa IV (Figura 6 B flecha y recuadro), sugiriendo que los machos también presentan un gradiente de neurodegeneración rostro-caudal. No se evidenció una clara correlación en la degeneración somática de la capa IV con la presencia de terminales en las capas I, IV y V, posiblemente debido a la escasa cantidad de neurodegeneración somática presente en los machos enteros (Figura 6 B). Adicionalmente, es interesante destacar que los machos, a diferencia de las hembras, mostraron degeneración somática aislada y muy esporádica en la capa V de la RSG (Figura 6 B, flecha y recuadro).

Sorprendentemente, el efecto de la gonadectomización fue totalmente diferente en machos y hembras. Comparadas a las hembras enteras, las hembras OVX no revelaron cambios apreciables en el patrón de neurodegeneración inducido por MK801 (Figura 6 A y C). Por el contrario, los machos ORQ mostraron un llamativo aumento en la argirofilia, adquiriendo un patrón neurodegenerativo similar al de las hembras. Esto incluyó el gradiente rostrocaudal y látero-medial de somas argirofílicas en la capa IV y abundante degeneración terminal en capas I, IV y V (Figura 5 A-D). Un análisis cuantitativo de somas argirofílicas en la capa IV de RSG en cortes sagitales, evidenció que el número de neuronas argirofílicas fue similar en hembras intactas y OVX (148 ± 8 y 133 ± 14 respectivamente). Por el contrario, los machos mostraron solo $2 \pm 0,5$ somas argirofílicas en la capa IV de la RSG y la castración indujo un notable aumento a 96 ± 23 . Un ANOVA de dos vías (sexo x castración) sobre el efecto de la degeneración inducida por MK801 en RSG reveló un efecto significativo del sexo ($F_{[1,17]} = 35,91$; $p < 0,000015$), de la castración ($F_{[1,17]} = 6,82$; $p < 0,01$), y de la interacción entre ambos, el sexo y la castración ($F_{[1,17]} = 13,03$; $p < 0,002$). El análisis *post-hoc* de Newman-Keuls reveló que los machos enteros eran significativamente diferentes a los otros grupos (*: $p < 0,0001$ vs hembras y OVX; #: $p < 0,0005$ vs ORQ) (Figura 6E). En conjunto, estos resultados indican que la sensibilidad de las neuronas de RSG a los efectos neurodegenerativos del MK801 es sexualmente dimórfica, y sugieren que las hormonas gonadales masculinas jugarían un rol protector.

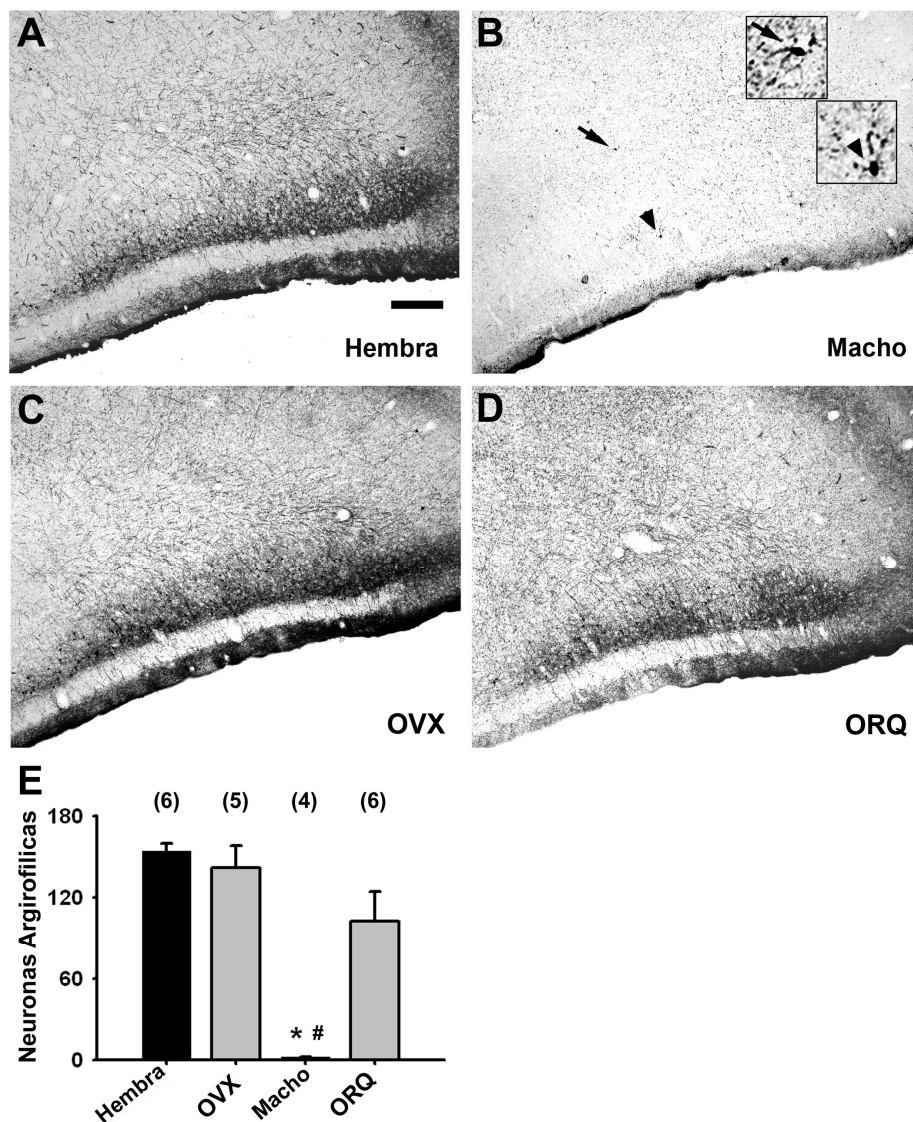


Figura 6: La orquiectomía elimina el efecto dimórfico de la toxicidad inducida por MK801 en la RSG. Ratas enteras y gonadectomizadas de ambos sexos fueron tratadas con una sola dosis i.p. de MK801 (5 mg/kg) y 3 días postratamiento analizadas con la técnica A-Cu-Ag. Microfotografía de bajo aumento de cortes sagitales de la RSG (lat. 1,4 mm) de: **(A)** hembra entera, **(B)** macho entero, **(C)** hembra ovariectomizada (OVX), **(D)** macho orquiectomizado (ORQ). El inserto en **(B)** corresponde a la ampliación de las neuronas de la capa IV (triángulo) y V (flecha). Se destaca el aumento de la neurodegeneración inducida en ratas ORQ. **(E)** Análisis cuantitativo de la neurodegeneración inducida por MK801 en RSG. Se cuantificaron y analizaron estadísticamente el número de somas argirofílicas en la capa IV de la RSG (lat. 0,9-1,4 mm). La neurodegeneración inducida en la RSG indicó un efecto significativo para el sexo ($F_{[1,17]} = 35,91$; $p < 0,000015$) y para la gonadectomía ($F_{[1,17]} = 6,82$; $p < 0,01$) con una interacción significativa entre el sexo x gonadectomía ($F_{[1,17]} = 13,03$; $p < 0,002$ por ANOVA de dos vías). Los machos enteros revelaron diferencias significativas con los otros grupos, analizado con el test *post hoc* de Neuman-Keuls (* $p < 0,0001$ vs. hembra; # $p < 0,0005$ vs ORQ). Otras comparaciones relevantes no fueron significativas. Los números entre paréntesis indican el número de casos (escala de barra: 200 μ m).

Para analizar el rol de las hormonas gonadales frente a los efectos neurotóxicos de MK801, ratas ORQ fueron tratadas con propionato de testosterona (TP), dehidrotestosterona (DHT), benzoato de estradiol (EB) o el correspondiente vehículo control (vh), aceite de sésamo. Las dosis de las hormonas utilizadas fueron escogidas en base a trabajos previos donde se mostró que las mismas restauraban el nivel hormonal normal en animales gonadectomizados (49, 62, 139). Como era de esperar, ratas ORQ + vh presentaron un robusto cuadro neurodegenerativo, similar al de las ratas ORQ mencionadas anteriormente (Figura 7 A). En cambio, en animales ORQ + TP la neurodegeneración mostró una notable disminución (Figura 7 C). En estos animales la degeneración terminal y los acopios en forma de manojos de dendritas en la capa I fueron prácticamente ausentes, permaneciendo algunos somas aislados tanto en las capas IV como en la V. Notablemente, en los animales ORQ + DHT, se observó una desaparición prácticamente completa de la neurodegeneración (Figura 7 D). En cambio los animales ORQ + EB mostraron el mismo patrón de neurodegeneración observado en ORQ + vh (Figura 7 B). El análisis cuantitativo de los somas argirofílicos en la capa IV de animales ORQ confirmó que EB no indujo cambios significativos, mientras que TP y en mayor medida DHT, disminuyeron significativamente el número de somas degenerados (Figura 7 E) (ANOVA de una vía $F_{[3,13]} = 5,28$; $p < 0,01$). Estos datos indican que en los machos, EB no previene ni estimula la toxicidad de MK801, mientras que los andrógenos ejercen un potente rol protector.

Para poner a prueba el rol protector de los andrógenos en la neurotoxicidad inducida por MK801, se analizó el efecto de vh, TP, DHT y EB en ratas OVX. Tal como se describió para animales ORQ, no se detectaron diferencias entre OVX + vh y OVX + EB, confirmando que EB no ejerce efectos apreciables en la neurotoxicidad inducida por MK801 (Figura 8 A y B). Llamativamente, TP no previno la neurotoxicidad inducida por MK801 en animales OVX, mientras que DHT reveló un efecto protector (Figura 8 C y D). Si bien el efecto protector de DHT en ratas OVX fue evidente, no alcanzó la magnitud observada en machos castrados, encontrándose aún algunos somas argirofílicos en la capa IV y notablemente en la V, patrón notablemente similar al observado en machos intactos (Figura 8 D). Análisis cuantitativos de los somas argirofílicos en la capa IV confirman el efecto protector de DHT en ratas OVX (32 ± 8 somas) (ANOVA de una vía $F_{[3,13]} = 13,97$; $p < 0,0002$), indicando que DHT significativamente protege a ciertas poblaciones de neuronas de la RSG en hembras gonadectomizadas (Figura 7 E).

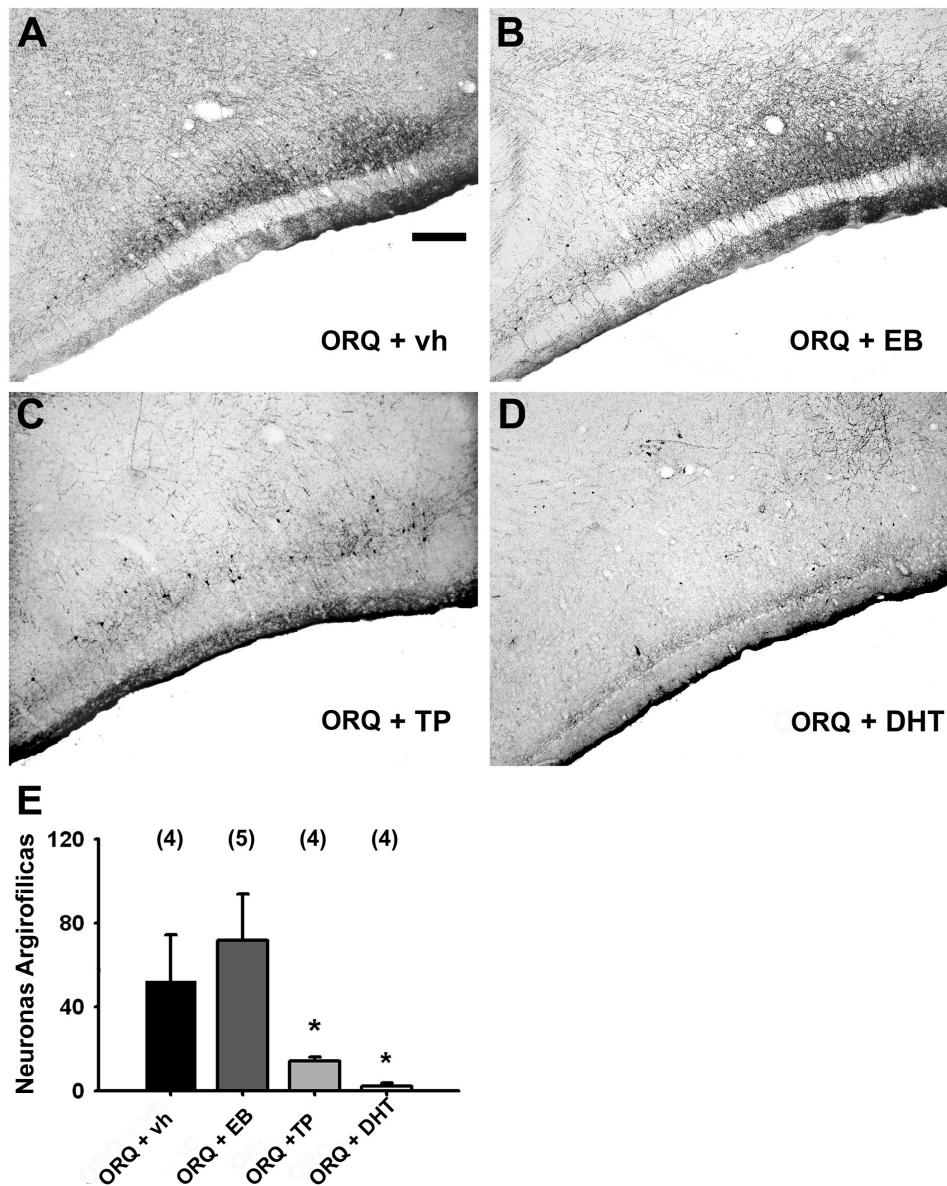


Figura 7: Andrógenos inhiben la toxicidad inducida por MK801 en la RSG de ratas ORC. Las ratas ORC fueron tratadas con vehículo (vh), benzoato de estradiol (EB), testosterona (TP) o dehidrotestosterona (DHT) por tres días consecutivos antes de una dosis i.p. de MK801 (5 mg/kg). La neurodegeneración en la RSG fue analizada tres días más adelante empleando la técnica A-Cu-AG. Microfotografías de las imágenes representativas de baja aumento de RSG (lat. 1,4 mm) de las ratas ORC tratadas con el vh (**A**), EB (**B**), TP (**C**), y DHT (**D**). Se observa que TP y DHT inhiben la toxicidad inducida por MK801. (**E**) Análisis cuantitativo de la neurodegeneración inducida por MK801 en la RSG. El número de somas argirofílicas en la capa IV de RSG (lat. 0,9 a 1,4 mm) fue registrado y analizado estadísticamente. * $p < 0,03$ contra ORC + vh por ANOVA; $F_{[3,13]} = 5,28$, seguido por la prueba *post hoc* de Newman-Keuls. En el paréntesis se indican el número de casos. Barra de escala equivale a 200 μ m.

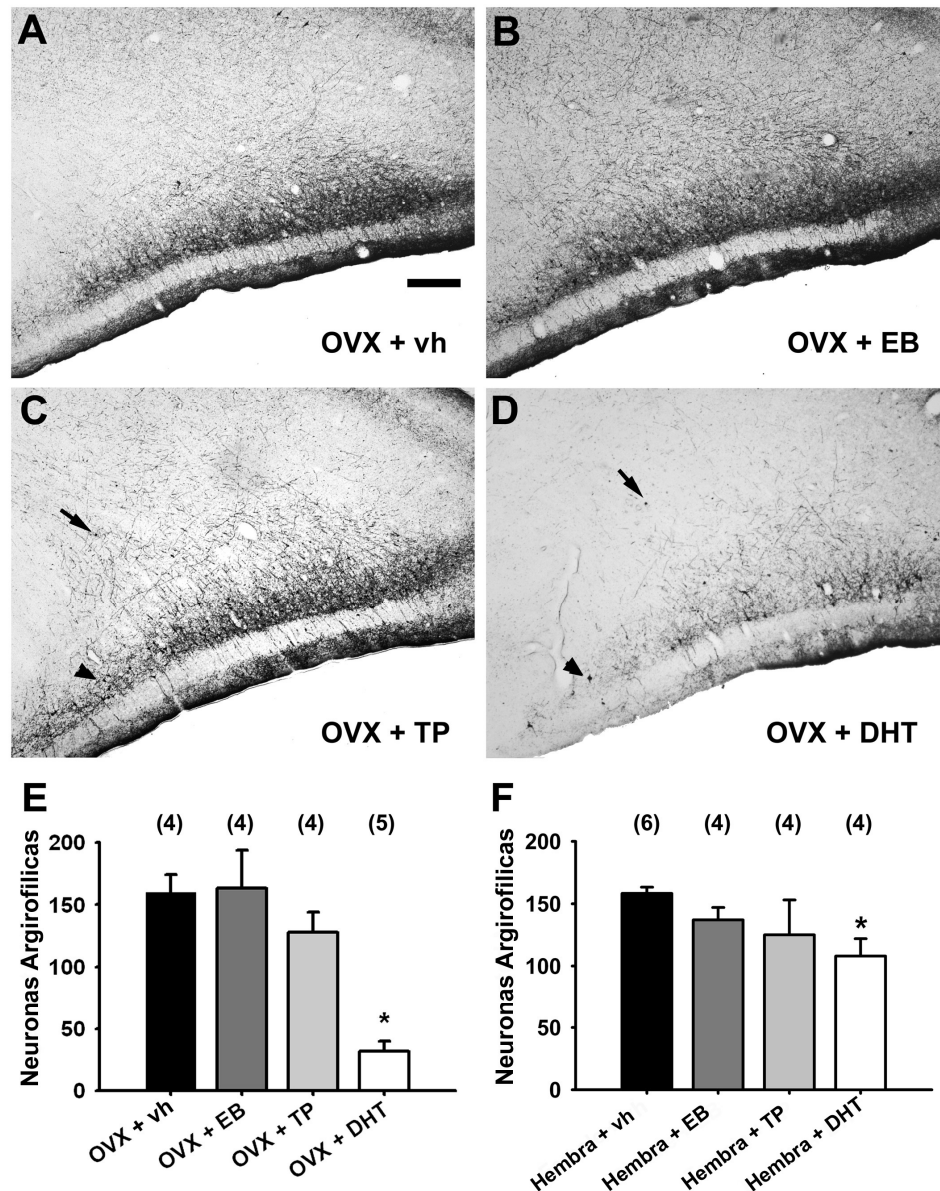


Figura 8: Dehidrotestosterona, pero no testosterona, inhibe la toxicidad inducida por MK801 en la RSG de ratas hembras intactas y OVX. Las ratas fueron tratadas con vh, EB, TP o DHT por tres días consecutivos antes de una sola dosis i.p. con de MK801 (5 mg/kg) y la neurodegeneración en la RSG fue analizada tres días más adelante empleando la técnica A-Cu-AG. Microfotografías de las imágenes representativas de baja aumento de la RSG (lat. 1,4 mm) de ratas OVX tratadas con vh (A), EB (B), TP (C), y DHT (D). Se destacan ejemplos de las neuronas que degeneran en la capa IV (punta de flecha) y la capa V (flecha) en C y D. Observe que DHT, pero no TP, inhibe la toxicidad inducida por MK801 en ratas OVX. (E-F), Análisis cuantitativo de la neurodegeneración inducida por MK801 en la RSG de las ratas hembras OVX e intactas. El número de somas argirofílicas en la capa IV de RSG (lat. 0,9 a 1,4mm) fue registrado y analizado estadísticamente. (E), * $p < 0,0007$ contra OVX + vh por ANOVA, $F_{[3,13]} = 13,97$, seguido por la prueba *post hoc* de Newman-Keuls. (F), * $p < 0,04$ contra hembra + vh por ANOVA $F_{[3,14]} = 3,43$, seguido por la prueba *post hoc* de Newman-Keuls. El resto de las comparaciones relevantes no fueron significativas. En el paréntesis se indican el número de casos. Escala de la barra: 200 μ m.

El efecto de las hormonas gonadales fue también analizado en hembras enteras donde se confirmó la protección con DHT, pero no de TP o EB. El análisis estadístico mostró una significativa disminución de la toxicidad de MK801 inducida por DHT en hembras enteras (Figura 8 F) (ANOVA de una vía, $F_{[3,14]} = 3,43$; $p < 0,04$). En conjunto estas observaciones confirman el efecto protector de DHT sobre la neurotoxicidad inducida por MK801, y asimismo revelan la posibilidad de que EB, que está presente en las hembras enteras y que además se forma por la aromatización de TP, obstruya la protección que puede ejercer DHT, la forma no aromatizable de la testosterona.

Para comprobar esta posibilidad, machos enteros fueron tratados con vh, TP, DHT y EB y posteriormente se analizó la neurotoxicidad inducida por MK801. Como era de esperar los tratamientos con andrógenos no cambiaron el escaso cuadro neurodegenerativo que normalmente presenta el macho entero. Por el contrario, machos enteros que recibieron el tratamiento de EB revelaron un importante incremento de neurodegeneración inducida por MK801, incluyendo el gradiente rostrocaudal y la presencia de somas argirofílicas en la capa IV con degeneración terminal en capas I, IV y V (Figura 9 A y B). El análisis cuantitativo de los somas argirofílicos de la capa IV (Figura 9 C) confirmó el aumento significativo de la neurodegeneración inducida por MK801 en machos intactos tratados con EB (40 ± 14 somas) (ANOVA $F_{[3,13]} = 7,6$; $p < 0,003$). En conjunto estos experimentos demuestran que las hormonas gonadales ejercen un efecto de sensibilización y/o de protección que es específico de la capa cortical, ya que en la capa V los andrógenos sensibilizan a ciertas neuronas frente a los efectos de MK801, en cambio el andrógeno no aromatizable DHT protege a las neuronas de la capa IV de la RSG de la neurotoxicidad inducida por MK801, donde el EB se contrapone a este efecto protector.

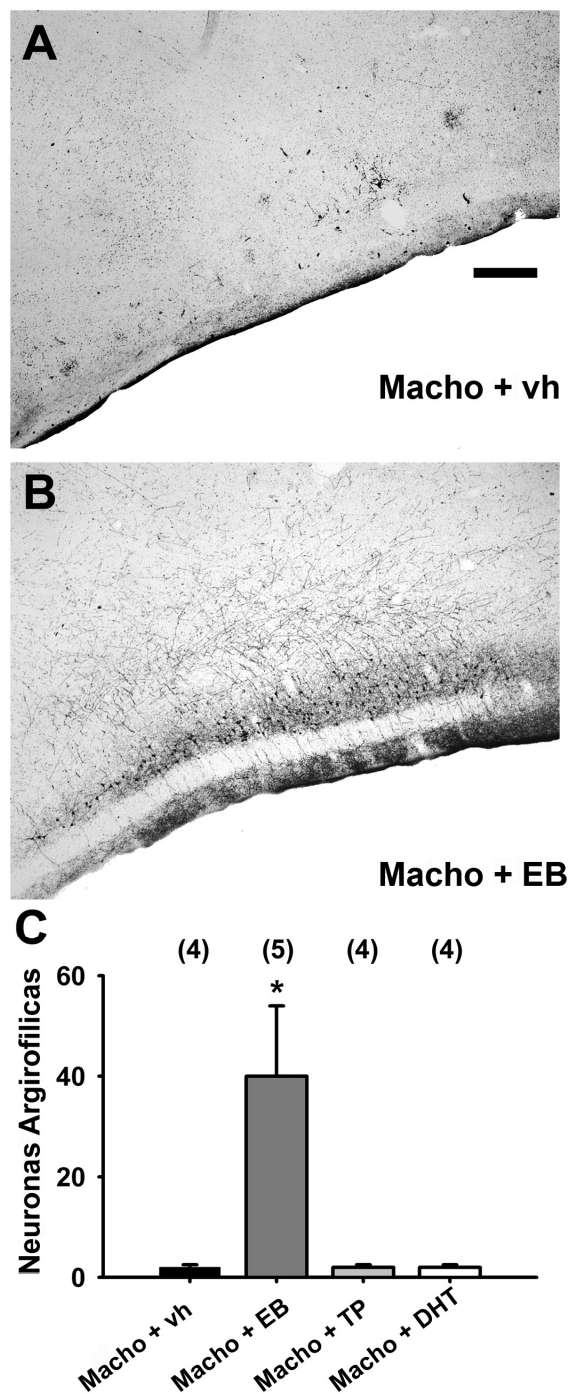


Figura 9: Benzoato de estradiol realza la toxicidad inducida por MK801 en la RSG de ratas macho enteras. Ratas macho enteras fueron tratadas con vh, EB, TP o DHT por tres días consecutivos antes de una sola dosis i.p. de MK801 (5 mg/kg) y la neurodegeneración en la RSG fue analizada tres días más adelante empleando la técnica A-Cu-AG. Microfotografías de las imágenes representativas de bajo aumento de la RSG (lat. 1,4 mm) de ratas macho tratados con el vh (**A**) y EB (**B**). Observe que el EB realza la toxicidad inducida por MK801 en la RSG. (**C**) Análisis cuantitativo de la neurodegeneración de la toxicidad inducida por MK801 en la RSG de ratas macho. El número de somas argirofílicas en la capa IV de la RSG (lat. 0,9 – 1,4 mm) fue registrado y analizado estadísticamente. * $p < 0,003$ contra macho + vh por ANOVA, $F_{[3,13]} = 7,6$ seguido por la prueba *post hoc* de Newman-Keuls. El resto de las comparaciones relevantes no fueron significativas. En el paréntesis se indican el número de casos. Escala de barra: 200 μm .

1.2 Determinación de la degeneración neuronal inducida por MK801 en ratas macho enteras y orquiectomizadas

Los datos presentados demuestran un marcado dimorfismo sexual en el efecto neurodegenerativo del MK801. Numerosos trabajos previos describieron en detalle las áreas sensibles, el curso temporal y la dosis dependencia del efecto neurodegenerativo del MK801 en la rata hembra (194, 75, 76), sin embargo no existe dicha caracterización para ratas machos. Por lo tanto en el siguiente grupo de experimentos se analizó de manera sistemática la neurotoxicidad irreversible en los machos enteros y ORQ. Inicialmente se examinó el efecto neurodegenerativo de diferentes dosis de MK801 (5, 10 y 15 mg/kg) luego de 3 días de sobrevida. Como previamente se demostró, la dosis de 5 mg/kg de MK801 induce en el macho entero un cuadro de neurotoxicidad apenas apreciable, mientras que en los ORQ se evidencia un cuadro intenso de neurotoxicidad, con un elevado número de somas argirofílicas en la RSG (Figura 6 B y D). Con la dosis de MK801 de 10 mg/kg, el macho entero muestra aumento en el número de somas argirofílicas en la RSG e incremento en el cuadro de degeneración terminal en la corteza retrosplenial disgranular (RSD) y en las capas I y IV de toda la corteza somatosensorial. La misma dosis de MK801 en los ORQ reveló un cuadro de neurodegeneración de mucha mayor magnitud en todas estas estructuras. Con dosis de 15 mg/kg se intensificó el cuadro neurodegenerativo en el macho entero y aún más en el ORQ. Sin embargo, debido a que esta dosis de MK801 produce efectos conductuales muy severos incluyendo signos de apnea y una muy lenta recuperación, con una significativa pérdida de peso y signos de deshidratación al momento del sacrificio, esta dosis no fue utilizada para experimentos subsiguientes.

Para analizar el curso temporal de la neurodegeneración inducida por MK801 en machos enteros y ORQ se seleccionó la dosis de 10 mg/kg y su efecto se evaluó luego de 24 hs, 48 hs, 72 hs y 120 hs. Considerando que la velocidad a la cual procede la muerte celular depende del mecanismo subyacente de la neurodegeneración y ello condiciona la posibilidad de ponerla de manifiesto según el tipo de técnica que se emplee (57-59, 113), la neurodegeneración se reveló empleando las técnicas A-Cu-Ag y FJB en cortes adyacentes. Si bien, a diferencia de la A-Cu-Ag, la técnica de FJB no permite revelar degeneración terminal (Figura 10 A, B, C y D), ambas técnicas mostraron un patrón de degeneración somática muy similar, lo que permitió determinar la degeneración somática con técnicas complementarias (Figura 10 A y B).

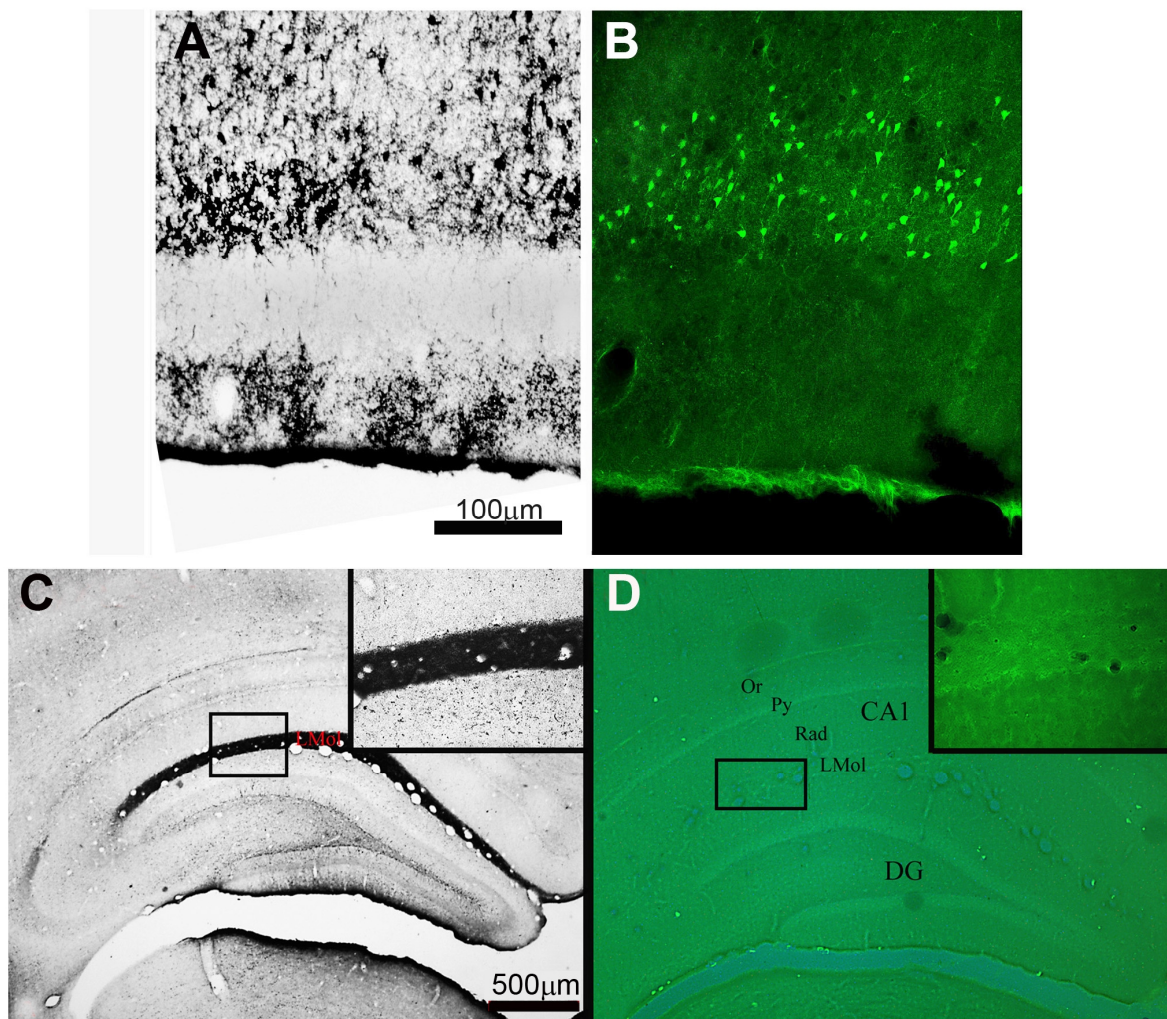


Figura 10: Cuadro comparativo de las técnicas amino cupro argéntica (A-Cu-AG) y Fluoro Jade B (FJB) en la detección de la degeneración inducida por MK801. **(A-B)** Comparación de la técnica A-Cu-AG y FJB en cortes sagitales de la RSG (lat. 1,2) de una rata macho ORQ tratada con MK801 (10 mg/kg) y sacrificada 3 días postratamiento. **(A)** En cortes sagitales la técnica A-Cu-AG muestra la degeneración terminal principalmente en las capa I y IV y una densa cantidad de somas argirofilicos en la capa IV de la RSG. **(B)** FJB tiñe los somas en la capa IV del RSG. La degeneración de dendritas que están teñidas con A-Cu-AG en la capa I y IV de la RSG no son evidentes con FJB. **(C-D)** Fotomicrografías de las técnicas A-Cu-AG y FJB en la detección de la degeneración terminal inducida por MK801 en cortes frontales (Bregma -3,8) en las áreas CA1 y CA2/CA4 del hipocampo de una rata macho ORQ tratada con MK801(10 mg/kg) sacrificada 3 días postratamiento. **(C)** A bajo aumento (25X) la técnica A-Cu-AG reveló una degeneración intensa y masiva de terminales que se refleja en el área teñida de negro en el campo CA1 del hipocampo, el cual se puede observar en la magnificación de 40X en el recuadro. **(D)** por el contrario, FJB no detecta ninguna degeneración terminal en ninguno de los aumentos.

A las 24hs, en la capa IV de la RSG se observaron los primeros signos de somas neurodegenerativos. En este tiempo de sobrevida, tanto en los machos enteros como en los ORQ, las neuronas fuertemente argirofílicas mostraron el soma y sus dendritas apicales con morfología aparentemente normal, pero con el axón en forma de tirabuzón, morfología típica de un estadio temprano de degeneración (Figura 11 A y B). La capa I de RSG mostró signos de degeneración dendrítica donde aún se pudo observar fibras enteras, algunas orientadas horizontalmente a la capa I y otras verticales, intercaladas con degeneración terminal puntiforme. En RSD predominó la degeneración terminal, mostrando una argirofilia más densa en la capa I, y más difusa en las capas profundas. Analizando áreas más laterales se observó degeneración terminal de la capa I y IV de la corteza somatosensorial, más específicamente en la corteza visual secundaria medio-medial, medio lateral y lateral (V1MM, V2ML y V2L) y corteza visual primaria (V1). Es interesante resaltar que la degeneración terminal cesa abruptamente aproximadamente en el inicio de la corteza motora secundaria (M2), la cual quedó libre de cualquier signo de degeneración detectable con la técnica A-Cu-Ag ó FJB. También se reveló degeneración terminal en la corteza perirhinal, ectorhinal (PRh, Ect), en la capa I de la corteza entorhinal (ENT), y en la capa CA1 del hipocampo dorsal. En cortes más laterales, se observaron algunas dendritas y somas argirofílicos dentro del núcleo amigdalino cortical postero-lateral (PLCo). En el bulbo olfatorio se encontró una gran cantidad de neuronas con características de degeneración apoptótica, comparables a la que se encuentra en la rata hembra (33, 34).

A las 48 hs, tanto en el macho entero como en el ORQ, el incremento de la degeneración en RSG y RSD fue notable, presentando un aumento en la cantidad de somas, fibras y terminales (Figura 11 C y D). Además en los ORQ se detectaron los primeros signos de muerte somática en la capa III de la corteza entorhinal y en PLCo. Por el contrario, estos caracteres de neurodegeneración no se observaron en el macho entero a este tiempo de sobrevida, donde en PLCo sólo se observaron rastros de algunas dendritas argirofílicas.

A las 72 hs posteriores al tratamiento de MK801 el número de neuronas argirofílicas en RSG reflejó su máxima expresión, presentando características de muerte en una etapa más avanzada, con dendritas fragmentadas y separadas del soma (Figura 11 E y F).

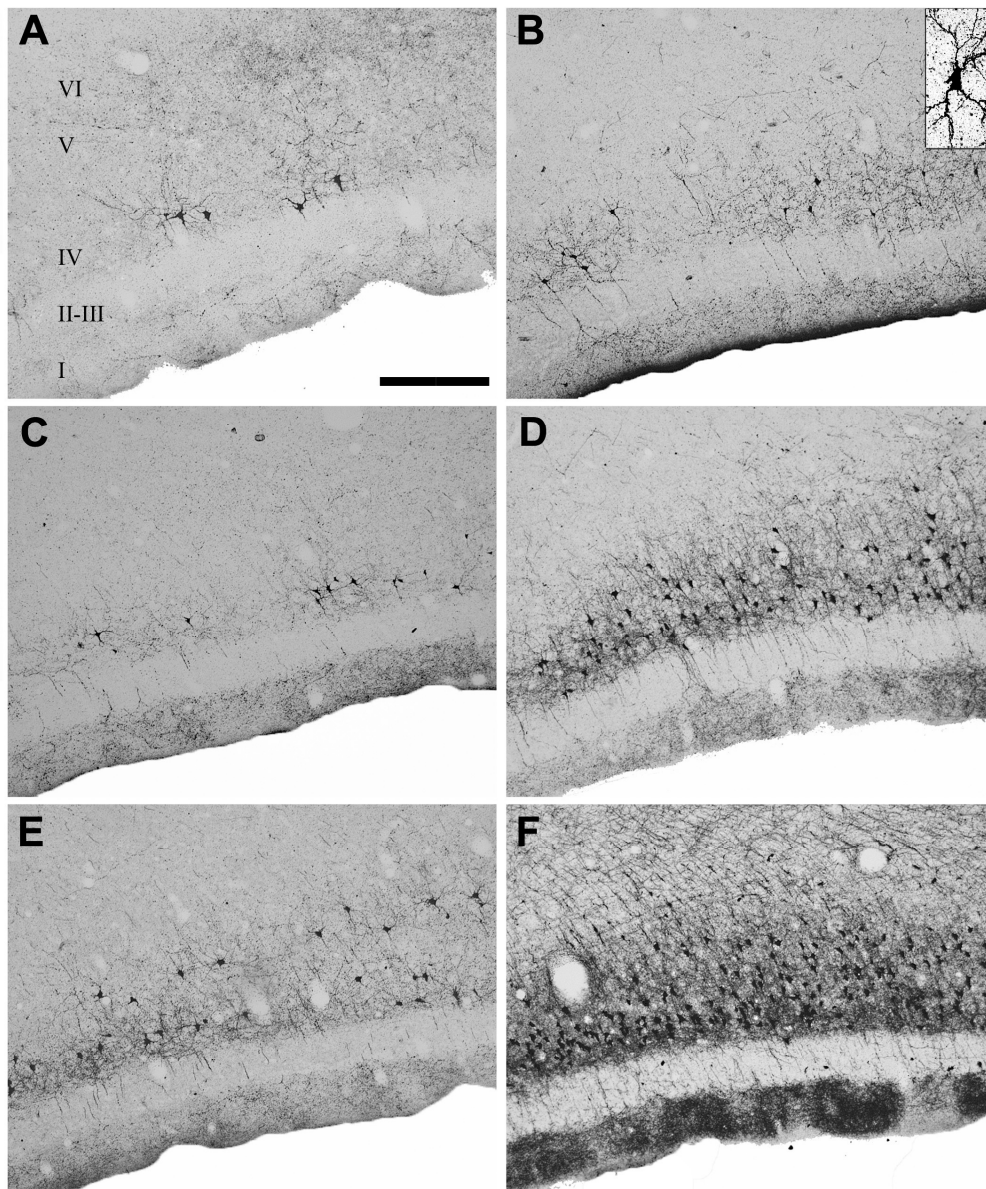


Figura 11: Curso temporal de la neurodegeneración inducida por MK801 en machos enteros y ORQ en la RSG. En ratas machos enteras y ORQ se administró una dosis de MK801 (10 mg/kg) y su efecto se evaluó luego de 24, 48 y 72 hs en cortes sagitales de la RSG (lat. 1,2). **(A-B)** 24 hs postratamiento de MK801 se observaron los primeros signos de somas neurodegenerativos en la capa IV de la RSG. Tanto en los machos enteros **(A)** como en los ORQ **(B)**, las neuronas fuertemente argirofílicas mostraron el soma y sus dendritas con morfología típica de un estadio temprano de degeneración (recuadro). **(C-D)** A las 48 hs postratamiento de MK801, tanto en el macho entero **(C)** como en el ORQ **(D)**, el incremento de la degeneración en la RSG fue notable, presentado un aumento en la cantidad de somas, fibras y terminales. **(E-F)** 72 hs posteriores al tratamiento de MK801, el número de neuronas argirofílicas en la RSG reflejó su máxima expresión tanto en el macho entero **(E)** como en el ORQ **(F)**, presentando características de muerte en una etapa más avanzada, con dendritas fragmentadas y separadas del soma. La diferencia de sensibilidad del ORQ es claramente visible, no solo por el número de somas argirofílicos, sino que también por la densidad de la degeneración terminal en la capa I de RSG. Escala de barra 200 μ m.

Semejante a la rata hembra con 72hs de sobrevida postratamiento de MK801, el macho también presentó un patrón de degeneración somatodendrítica en la capa IV con un gradiente látero-medial (0,1-1,55 mm) (Figura 12 A, B, C, D) y rostrocaudal, (1,8-7,3 del Bregma) (Figura 12 E). Sin embargo, somas argirofílicas se detectaron no solo en la capa IV, sino que además en la capa V, mientras que dendritas, axones y terminales se observaban en las capas I, IV y V, dejando las capas II y III libres de marca. A su vez el gradiente rostrocaudal fue más pronunciado, casi delineado las subdivisiones RSGb y RSGa. La degeneración terminal se detectó no sólo en RSG, sino que también en RSD, capa I y IV de la corteza somatosensorial, más específicamente en V2MM, V2ML, V1M, V2L, corteza auditiva (Au), corteza de asociación temporal (TeA), PRh, ECT y ENT, capa CA1 del hipocampo y esporádicamente en el pre y post subiculum (Figura 13 A y B). En los ORQ la degeneración terminal fue aún más intensa en las estructuras mencionadas, y además se revelaron somas argirofílicas en la capa III de la ENT, y en PLCo. Es importante señalar que la degeneración de terminales puestos de manifiesto con la A-Cu-Ag, no fueron detectadas con FJB, que sólo permitió visualizar somas degenerativos. Por último, a las 120 hs se observó una clara reducción del patrón degenerativo tanto en machos enteros como ORQ. En este punto temporal el macho entero prácticamente no reveló signos de degeneración y solo en el ORQ se pudo observar que la RSG sigue siendo la región más afectada, aunque el cuadro degenerativo mostró una mayor fragmentación axonal de las células muertas y pocas neuronas con morfología completa, sugiriendo que no se reclutan nuevas neuronas. Dentro de las estructura hipocámpales CA1 aún presenta el cuadro de degeneración terminal, siendo difícil determinar si es menos densa que en etapas anteriores de sobrevida. En RSD, V2MM, Post, Ect, PRh, Au y ENT la degeneración terminal se encontró restringida a la capa I. La corteza visual mantuvo el patrón degenerativo más denso dentro de las áreas neocorticales, aunque en menor grado que a las 72 hs.

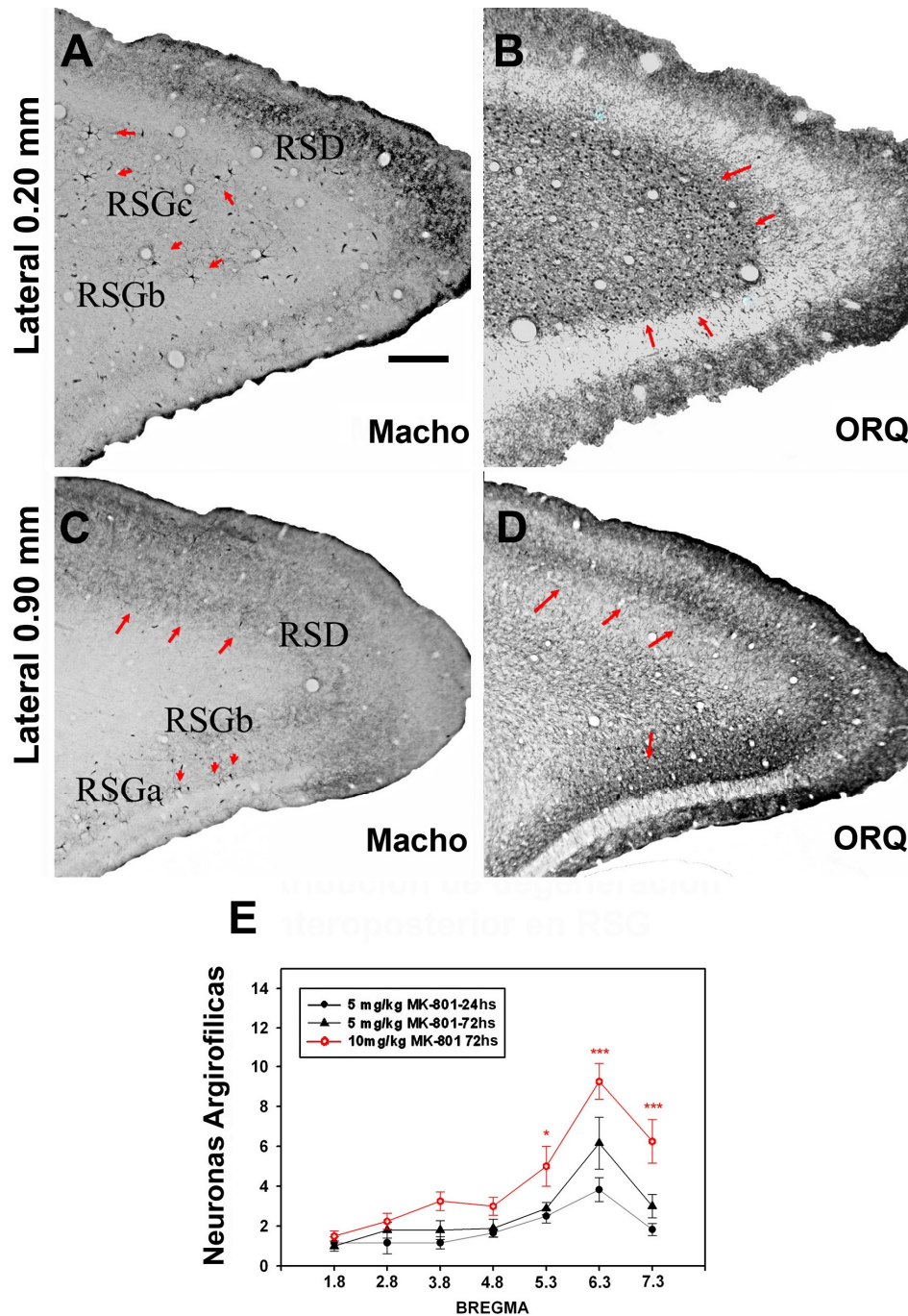


Figura 12: Degeneración látero-medial y antero-posterior en la RSC inducida por MK801 en ratas macho enteros y ORQ. Ratas macho enteros y ORQ fueron tratados con MK801 (10 mg/kg) y la neurodegeneración en la RSG fue analizada tres días más adelante utilizando la técnica A-Cu-AG. Análisis cualitativo de la degeneración látero-medial de la rata macho entero y ORQ en cortes sagitales. (A y C) Macho entero a diferentes alturas, lateral 0,20 mm (A) y 0,90 mm (C) de la línea media, las flechas rojas indican somas argirofílicas. (B y D) ORQ a diferentes alturas laterales 0,20 mm (B) y 0,90 mm (D) de la línea media, las flechas rojas indican los somas argirofílicos que cubren la RSGc, principalmente en cortes más mediales. (E) Análisis semicuantitativo en ratas macho enteros de la RSG en cortes frontales revelados con la A-Cu-Ag con 5 mg/kg (círculo negro y triángulo negro) y 10 mg/kg (círculo rojo) de MK801 y con diferentes sobrevividas, 24 hs (círculo negro) y 72 hs (triángulo negro y círculo rojo). La cantidad de somas argirofílicas incrementa caudalmente, y es significativamente mayor con 10mg/kg (***p < 0,0001; * p < 0,5).

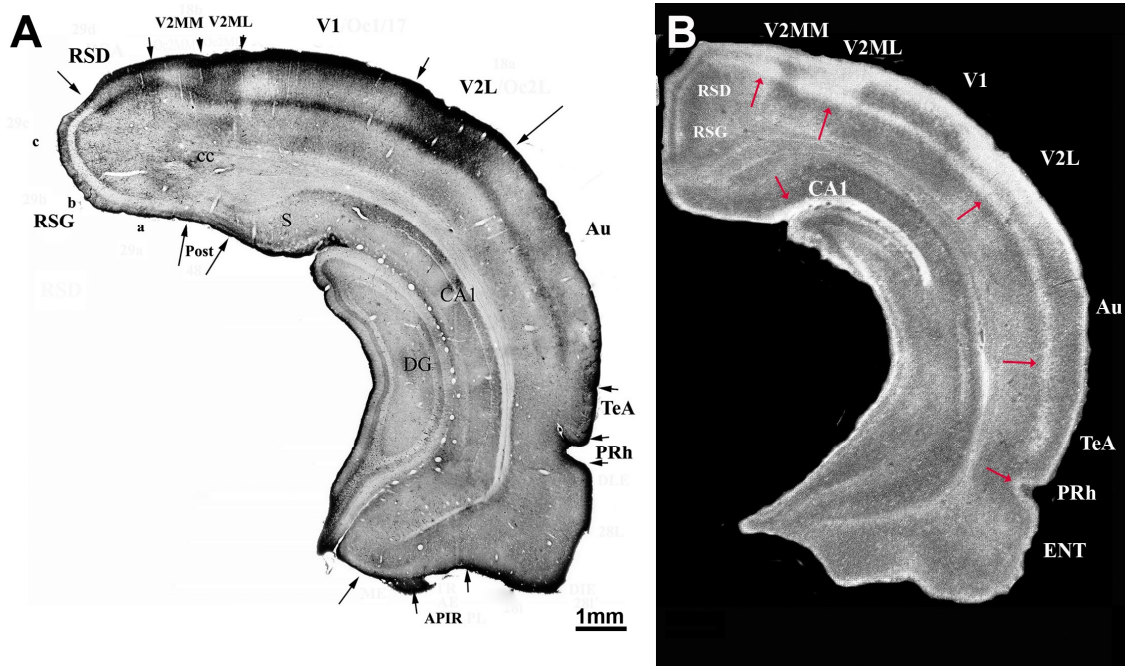


Figura 13: Degeneración terminal inducida por MK801 en la rata ORQ. Ratas macho ORQ fueron tratadas con MK801 (10 mg/kg) y la neurodegeneración en la RSG fue analizada tres días más adelante utilizando la técnica A-Cu-AG. **(A)** Corte frontal (Bregma -6,24 mm) de bajo aumento, revelando la degeneración terminal en diferentes áreas corticales de la rata ORQ. En RSD predominó la degeneración terminal, mostrando una argirofilia más densa en la capa I, y más difusa en las capas profundas. Analizando áreas más laterales se observó degeneración terminal de la capa I y IV de la corteza somatosensorial, más específicamente en la corteza visual secundaria medio-medial, medio lateral y lateral (V1MM, V2ML y V2L) y primaria (V1). También se reveló degeneración terminal en la corteza perirhinal, ectorhinal (PRh, Ect), en la capa I de la corteza entorhinal (ENT). Abreviaturas: Au: Corteza auditiva; CA1: campo CA1 del hipocampo; cc: cuerpo caloso; cg: cíngulo; DG: giro dentado; Post: postsubiculum; S: Subiculum; TeA: Corteza de asociación temporal. **(B)** Microfotografía de la degeneración terminal de la corteza (Bregma -5,64 mm) a bajo aumento en campo oscuro. La argirofilia de las terminales en el campo oscuro se aprecia aún mejor por el brillo intenso que se revela.

En conjunto estos resultados demuestran que el efecto neurodegenerativo inducido por una dosis aguda i.p. de MK801 (10 mg/kg) en el macho alcanza su máximo luego de 72 hs. Además, pudo constatar que las áreas afectadas son similares para machos intactos y ORQ, sin embargo la magnitud de la degeneración es claramente mayor en el ORQ.

2) ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS MORFOFUNCIONALES INDUCIDOS POR EL EFECTO NEUROTÓXICO DE MK801

Estudio de la inducción de proteínas codificadas por los genes de expresión temprana

2.1. Activación neuronal revelada con la expresión de la proteína c-Fos: Efecto del tratamiento de una dosis aguda neurotóxica de MK801

Los genes de expresión temprana (GETs) llevan su nombre debido a que se inducen rápidamente luego de que las neuronas que los portan son estimuladas adecuadamente. La inducción del c-Fos, un GET, es utilizado como herramienta de mapeo anatómico funcional para identificar células y circuitos que se activan en la respuesta a diversos estímulos (136). Además, trabajos previos han relacionado la expresión continua y prolongada de c-Fos con la neurodegeneración programada en vivo (233; 278). Para identificar las poblaciones neuronales involucradas en la respuesta inducida por una dosis aguda y neurotóxica de MK801, se analizó la expresión de la inmunorreactividad de la proteína c-Fos en áreas de la corteza y de la AEX.

Se analizaron cualitativamente y a diferentes tiempos de sobrevida los cambios en la expresión de la inmunorreactividad de la proteína c-Fos en machos control, tratados con salina (ClNa 0,9%), y experimentales, tratados con MK801 (10 mg/kg). En todos los tiempos de sobrevida analizados, los animales controles mostraron una inmunorreactividad basal de c-Fos nula, a excepción de neuronas aisladas que se encontraron azarosamente en diferentes áreas del cerebro. Por el contrario, a las tres horas de sobrevida de la inyección de MK801, una inducción robusta se detectó en la capa IV de RSG y RSD, como así también en la capa IV de toda la neocorteza somatosensorial incluyendo V2MM y V2L. La corteza entorhinal (ENT) reveló un marcado incremento en la capa III, lo que es consistente con observaciones previas (79-81, 247, 282). Dentro de la AEX, el núcleo central lateral (CeL) reveló un pequeño incremento en el número de células marcadas, que también se pudo observar en el núcleo del lecho de la estría terminal lateral (BSTL), pero no en los otros núcleos amigdalinos. Este cuadro se mantuvo igual a las 8 horas del tratamiento de MK801 (Figura 14). Llamativamente, la robusta inducción de c-Fos de áreas específicas analizadas se mantuvo con similar intensidad aún 24 horas postinyección (Figura 14), restableciendo los niveles prácticamente basales recién luego de 72 horas (Figura 14).

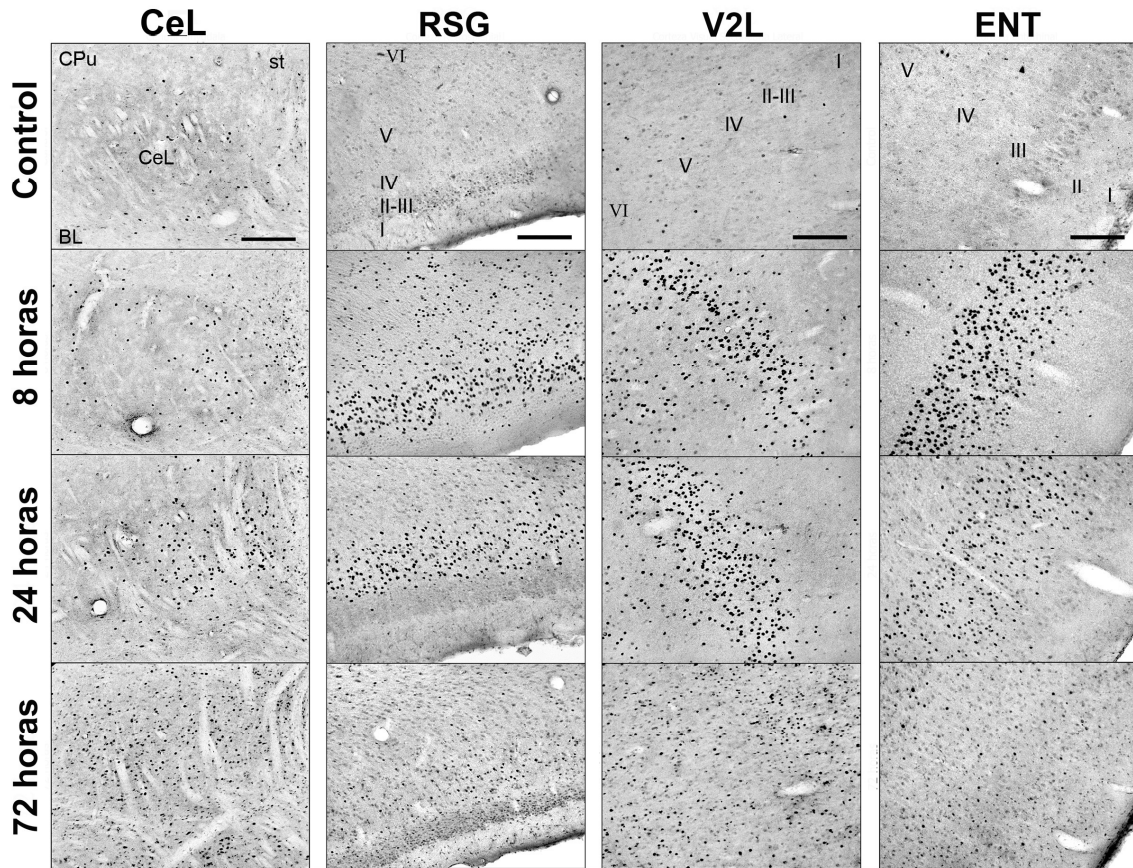


Figura 14: Análisis cualitativo de los cambios en la expresión de la inmunorreactividad de la proteína c-Fos a diferentes tiempos de sobrieda en ratas control, tratados con salina, y experimentales, tratados con MK801 (10 mg/kg). En los animales **control**, se revela una inmunorreactividad basal de c-Fos prácticamente nula, a excepción de neuronas aisladas que se encontraron azarosamente en CeL y V2L. A las **8 horas** del tratamiento con MK801, dentro de la amígdala extendida, el núcleo central lateral (CeL) (lat. 4,2 mm), reveló un pequeño incremento en el número de células marcadas. Una inducción robusta de la proteína c-Fos se detectó en la capa IV de la RSG (lat. 1,4 mm) y también en la capa IV de toda la corteza visual secundaria medio medial y lateral (V2MM y V2L) (lat. 1,55 mm). La corteza entorhinal (ENT) (lat. 4,32 mm) reveló un marcado incremento en la capa III. A las **24 horas** la inducción de la proteína c-Fos se mantuvo en CeL, RSG, V2L pero en ENT se aprecia la disminución de la misma. A las 72 horas en CeL se mantiene una señal de la proteína c-Fos, sin embargo, en RSG, V2L y ENT los niveles habían disminuido notablemente. Los números romanos (I-VI) en RSG, V2L y ENT indican las capas corticales. Abreviaturas: BL: Núcleo amigdalino basolateral; CPu: Caudado Putamen; st: estria terminali. Escala de barra: 200µm.

Se analizó cuantitativamente la inmunorreactividad a c-Fos luego de 3 días de administración encontrándose que MK801 indujo un significativo incremento en el número de neuronas c-Fos restringidas a CeL ($p < 0,001$) (Figura 15 A y B); BSTL ($p < 0,001$) (Figura 15 C y D); V2MM ($p < 0,002$) y en V2L ($p < 0,05$) (ANOVA de dos vías: tratamiento x área, tratamiento $F_{[1,4]} = 11,91$; $p < 0,02601$; área $F_{[11,44]} = 82,37$; $p < 0,0001$; interacción tratamiento y área $F_{[11,44]} = 4,25$; $p < 0,0003$; test *post hoc* de Newman Keuls) (Figura 15 E). Estos resultados muestran que una dosis neurotóxica de MK801 promueve

una expresión de c-Fos sostenida en el tiempo, sugiriendo que la toxicidad inducida por el fármaco desencadena cambios adaptativos prolongados.

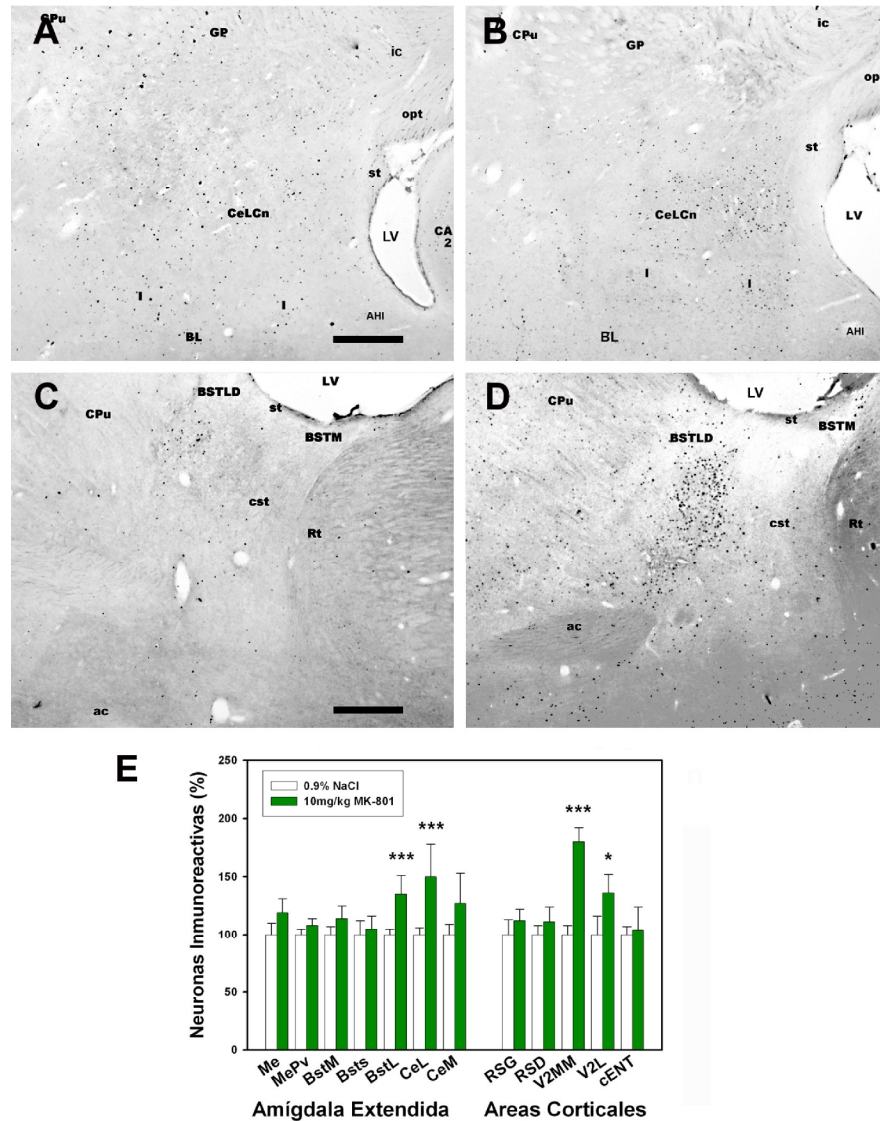


Figura 15: El MK801 induce una marca sostenida en el tiempo de c-Fos en la amígdala central lateral (CeL) y en el núcleo del lecho de la estría terminal lateral (BSTL). Microfotografía de bajo aumento de cortes sagitales de la CeL (lat. 4,20 mm) de ratas macho enteros tratadas con ClNa (0,9%) (A) y MK801 (10 mg/kg) (B) con 72 horas de sobrevida. (C-D) Microfotografía de bajo aumento, de cortes sagitales del BSTL (lat. 1,9 mm) en la ratas tratados con ClNa 0,9% (C) y MK801 (10 mg/kg) (D). (E): Análisis cuantitativo de la inmunoreactividad a c-Fos en diferentes núcleos amigdalinos y área corticales luego de 3 días de la administración de MK801 (10 mg/kg). Se reveló que MK801 indujo un significativo incremento en el número de neuronas c-Fos restringidas a CeL (***p* < 0,001); BSTL (***p* < 0,001); V2MM (***p* < 0,002) y en V2L (**p* < 0,05). ANOVA de dos vías: tratamiento x área; tratamiento $F_{[1,4]} = 11,91$; $p < 0,02601$; área $F_{[11,44]} = 82,37$; $p < 0,0001$; interacción tratamiento y área $F_{[11,44]} = 4,25$; $p < 0,0003$; test *post-hoc* de Newman Keuls. Abreviaturas: ac: comisura anterior; AHI: Area amígdalohipocampal; BL: Núcleo amigdalino basolateral; BSTLD: Núcleo del lecho de la estría terminal lateral división dorsal; BSTM: Núcleo del lecho de la estría terminal medial; CPu: Caudado putamen; cst: comisura de la estría terminal; GP: Globo pálido; ic: Capsula interna; Opt: Tracto óptico; Rt: Núcleo talámico reticular; st: Estría terminal; VL: Ventrículo lateral. Escala de barra: 200 μ m

2.2 Efecto del tratamiento de una dosis aguda neurotóxica de MK801 sobre la expresión de proteínas FosB/ Δ FosB en diferentes estructuras de la amígdala extendida y de la corteza

Ha sido ampliamente estudiado que la exposición a drogas de abuso causa la inducción temporal de factores de transcripción FosB y Δ FosB en diferentes áreas del cerebro (14, 106, 110, 159, 170, 191, 192). Δ FosB es una isoforma truncada de FosB, cuya expresión persiste durante varias semanas debido a la inusual estabilidad de esta proteína ya que carece de dominios que normalmente se encuentran en el c-terminal de FosB y otras proteínas de la familia Fos (37). A su vez, la inducción de Δ FosB en regiones específicas del cerebro ha sido relacionada con mecanismos de plasticidad neuronal y cambios adaptativos que estarían asociados a diversas condiciones como la adicción a drogas, estrés, depresión, antipsicóticos, antidepresivos, neurotoxicidad inducida por ácido kaínico y denervación dopaminérgica (159). Para estudiar si los efectos neurotóxicos de MK801 inducen un proceso de adaptación neuronal prolongado en estructuras corticales y amigdalinas, se analizó la inmunorreactividad a la proteína FosB/ Δ FosB, 3 días luego de la administración de una dosis neurotóxica de MK801 (10 mg/kg).

Al analizar la expresión de la inmunorreactividad a FosB/ Δ FosB, se observó la inmunomarca confinada exclusivamente al núcleo celular. En ratas machos controles tratados con salina se observó una inmunorreactividad basal tenue en los núcleos CeL y CeM, y Me, y en sus respectivos núcleos rostrales, BSTL y BSTM. En las estructuras corticales RSG, RSD, V2MM y V2L se observó una moderada expresión basal en las capas II, III, V y VI (Figura 16 A, C y E). En la corteza ENT la expresión basal se encontró restringida a las capa II, IV, V y VI, aunque con una inmunorreactividad mucho más leve (Figura 16 E, 19 A y C).

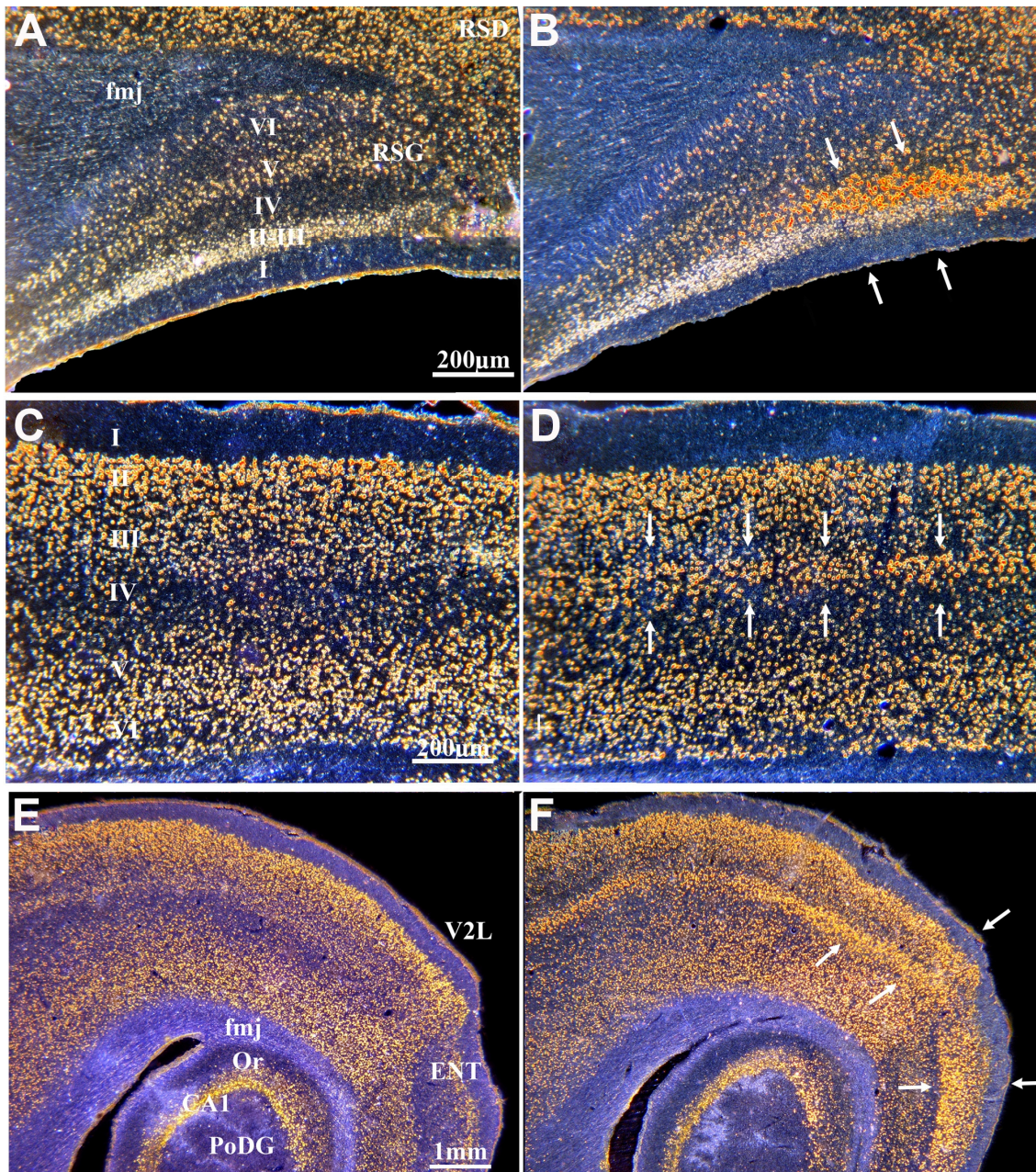


Figura 16: El MK801 induce una marca sostenida en el tiempo de la expresión de proteínas FosB/ Δ FosB en diferentes estructuras corticales de la rata macho entera. Se analizó la inmunorreactividad a FosB/ Δ FosB en ratas macho enteros 3 días postratamiento de CINA (0,9%) o de MK801 (10 mg/kg). **(A-B)** Fotomicrografías de campo oscuro a bajo aumento de la expresión de FosB/ Δ FosB en la corteza retrosplenial (RSG); **(C-D)** corteza visual secundaria mediomedial (V2MM) y **(E-F)** corteza visual secundaria lateral (V2L) y corteza entorhinal (ENT). En ratas machos controles tratados con CINA (0,9%) se observó una moderada inmunorreactividad basal en las capas II, III, V y VI de la RSG **(A)** y V2MM **(C)**. En la corteza ENT **(E)** la expresión basal se encontró restringida a la capa II, V y VI. Las ratas tratadas con MK801 mostraron una clara y robusta inducción de la inmunorreactividad de FosB/ Δ FosB principalmente en la capa IV (flechas blancas) de la RSG **(B)**, V2MM **(D)**, V2L **(F)** y en la capa III de la corteza ENT **(F)**. Abreviaturas: CA1: campo CA1 del hipocampo; fmj: Cuerpo calloso forceps mayor; Or: capa de Orions del hipocampo; PoDG: Capa polimórfica del giro dentado.

Las ratas macho tratadas con MK801 mostraron una clara y robusta inducción de la inmunorreactividad de FosB/ Δ FosB en las estructuras corticales definidas, exclusivamente en la capa IV de la corteza retrosplenial y visual, y en la capa III de la corteza ENT (Figura 16 B, D y F; Figura 17 A y B). Por el contrario, no se detectaron cambios en los núcleos amigdalinos. Un detallado análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a FosB/ Δ FosB en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas confirmó un significativo incremento del número de neuronas FosB/ Δ FosB en las estructuras corticales analizadas. Un ANOVA de dos vías (tratamiento x área) reveló un efecto significativo del tratamiento de MK801 ($F_{[1,6]} = 60,99$; $p < 0,0002$); del área ($F_{[11,66]} = 16,26$; $p < 0,0000$) y de la interacción entre el tratamiento y área ($F_{[11,66]} = 12,76$; $p < 0,0000$). El posterior test *post hoc* de Newman Keuls confirmó que no existían diferencias significativas en los núcleos amigdalinos Me, BSTM, BSTS, CeL, CeM ni BSTL (Figura 17 E). Por el contrario, el análisis *post hoc* de las estructuras corticales confirmó un significativo incremento específicamente en la capa IV de las cortezas RSG; ($p < 0,0001$), RSD ($p < 0,006$), V2L ($p < 0,0001$), V2MM ($p < 0,007$) (Figura 17 E). De manera similar, se reveló una diferencia significativa en la capa III de la corteza ENT ($p < 0,0001$) (Figura 17 E).

Es interesante señalar que estas estructuras corticales en animales tratados con MK801 presentan degeneración terminal, indicando que podría existir una relación entre la degeneración de terminales y el incremento de la expresión de FosB/ Δ FosB. Consistente con esta observación las áreas amigdalinas no muestran degeneración terminal, ni cambios en la expresión de FosB/ Δ FosB inducidas por el MK801. Para poner de manifiesto si existe una correlación entre el aumento de la neurodegeneración terminal y la expresión de FosB/ Δ FosB se analizó el efecto de MK801 en ratas macho ORQ, en donde se produce un incremento en la degeneración somática y terminal con la misma dosis de MK801 (10 mg/kg). Los resultados muestran que en machos ORQ controles (salina), la cantidad y distribución de neuronas FosB es similar a la de los machos enteros (salina), indicando que la orquiectomía per se no afecta la expresión basal de FosB/ Δ FosB. Además se observó que en machos ORQ el MK801 induce la expresión de FosB/ Δ FosB restringida a las mismas áreas corticales que los machos enteros, o sea en RSG ($p < 0,0001$), RSD ($p < 0,0002$), V2MM ($p < 0,0001$), V2L ($p < 0,0001$) y ENT ($p < 0,0001$), (ANOVA de dos vías: tratamiento x área, tratamiento $F_{[1,6]} = 380$; $p < 0,000001$; área $F_{[11,66]} = 16,26$; $p < 0,0000$; interacción tratamiento x área $F_{[11,66]} = 12,76$; $p < 0,0000$; test *post hoc* de Newman Keuls) (Figura 17 F).

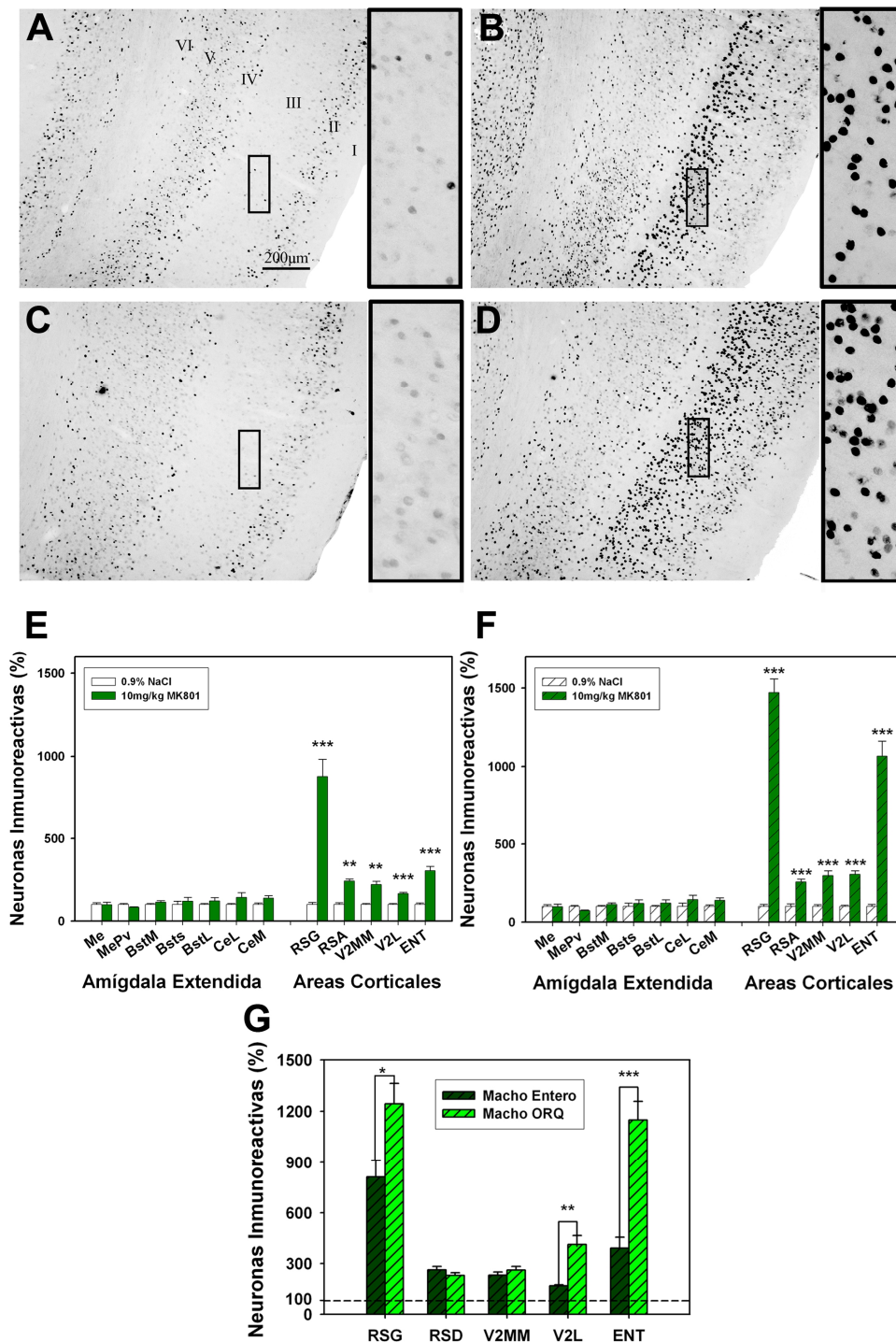


Figura 17: Comparación de la inducción de FosB/ Δ FosB entre machos enteros y ORQ en diferentes áreas corticales sensibles a los efectos neurotóxicos de MK801. Se analizó la inmunorreactividad a FosB/ Δ FosB en ratas macho enteros (A-B) y ORQ (C-D) 3 días postratamiento de una sola dosis de CINA (0,9%) o de MK801 (10 mg/kg). Fotomicrografías de la corteza entorhinal (ENT) de ratas macho enteros tratados con CINA (A) y MK801 (B). En el recuadro la ampliación de los somas de la capa III de la ENT muestra la clara inducción de FosB/ Δ FosB. De manera semejante se analizó la inmunorreactividad de FosB/ Δ FosB en animales ORQ tratados con salina (C) y MK801 (D). Los resultados muestran que en los ORQ controles (C), la cantidad y distribución de neuronas FosB/ Δ FosB es similar a la de los machos enteros (A), indicando que la orquiectomía no afecta la expresión basal de FosB/ Δ FosB. En el ORQ tratado con MK801 (D) se puede apreciar la marca incrementada de FosB/ Δ FosB. (E) Un

detallado análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a FosB/ Δ FosB en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas de la rata macho entero confirmó un significativo incremento del número de neuronas FosB/ Δ FosB en las estructuras corticales analizadas. Un ANOVA de dos vías (tratamiento x área) reveló un efecto significativo del tratamiento de MK801 ($F_{[1,6]} = 60,99$; $p < 0,0002$); del área analizada ($F_{[11,66]} = 16,26$; $p < 0,0000$) y de la interacción entre el tratamiento y el área ($F_{[11,66]} = 12,76$; $p < 0,0000$). El análisis *post-hoc* de las estructuras corticales confirmó un significativo incremento específicamente en las capas IV de las cortezas RSG ($p < 0,0001$), RSD ($p < 0,006$), V2L ($p < 0,0001$), V2MM ($p < 0,007$) y en la capa III de la corteza ENT ($p < 0,0001$). En los ORQ (**F**) se observó que el MK801 induce la expresión de FosB/ Δ FosB restringida a las mismas áreas corticales que los machos enteros, o sea en RSG ($p < 0,0001$), RSD ($p < 0,0002$), V2MM ($p < 0,0001$), V2L ($p < 0,0001$) y ENT ($p < 0,0001$), (ANOVA de dos vías: tratamiento x área, tratamiento $F_{[1,6]} = 380$; $p < 0,000001$; área $F_{[11,66]} = 16,26$; $p < 0,0000$; interacción tratamiento x área $F_{[11,66]} = 12,76$; $p < 0,0000$; test *post hoc* de Newman Keuls). (**G**) Análisis comparativo de la inducción de FosB/ Δ FosB entre ratas macho enteras y ORQ. Se realizó un ANOVA de tres vías (tratamiento x sexo x área), donde se confirmó el efecto significativo del tratamiento $F_{[1,12]} = 412$; $p < 0,000000$; del sexo $F_{[1,12]} = 13,51$; $p < 0,003173$; y del área $F_{[4,48]} = 40,24$; $p < 0,000000$, y que además existía una interacción entre el tratamiento y el área ($F_{[4,48]} = 33,11$; $p < 0,000000$), revelando que áreas corticales RSG ($p < 0,05$), V2L ($p < 0,01$) y ENT ($p < 0,04$) presentaban un cuadro más intenso de inmunorreactividad en el macho ORQ que en el macho entero

Para evaluar si el incremento de la inducción de FosB/ Δ FosB era significativamente mayor en la rata macho ORQ se realizó la comparación cuantitativa entre la expresión de proteínas de la familia FosB/ Δ FosB de los animales tratados con MK801 enteros y ORQ en las estructuras corticales donde anteriormente se habían encontrado diferencias significativas, o sea en RSG, RSD, V2MM, V2L y ENT. Se analizó la ORQ como una diferencia en el sexo, realizándose un ANOVA de tres vías (tratamiento x sexo x área), donde se confirmó el efecto significativo del tratamiento de MK801 ($F_{[1,12]} = 412$; $p < 0,000001$), de la orquiectomía ($F_{[1,12]} = 13,51$; $p < 0,003173$); y del área analizada ($F_{[4,48]} = 40,24$; $p < 0,000001$), y que además existía una interacción entre el tratamiento y el área ($F_{[4,48]} = 33,11$; $p < 0,000001$), revelando que ciertas áreas corticales presentaban un cuadro más intenso de inmunorreactividad en el macho ORQ que en el macho entero, como por ejemplo en RSG ($p < 0,05$), V2L ($p < 0,01$) y ENT ($p < 0,04$) (test *post hoc* de Newman Keuls) (Figura 17 B, D y G).

Estas observaciones sugieren que podría existir una relación entre la presencia de terminales degenerativos y la inducción de FosB/ Δ FosB. Para poner de manifiesto esa posibilidad se realizó una doble marcación con FosB/ Δ FosB y A-Cu-Ag. En las áreas corticales RSG, RSD, V2MM y V2L se había observado que las capas II, III, V y VI, libres de degeneración terminal, no mostraban alteraciones en la expresión de FosB/ Δ FosB con respecto al control (Figura 16). Por el contrario, la degeneración terminal confinada a la capa I y IV de estas estructuras corticales, coincidió

topográficamente con una incrementada inmunorreactividad a FosB/ Δ FosB (Figura 18 y 19), sugiriendo que en esas áreas corticales la inducción de FosB/ Δ FosB podría estar ligada a la degeneración de las terminales aferentes.

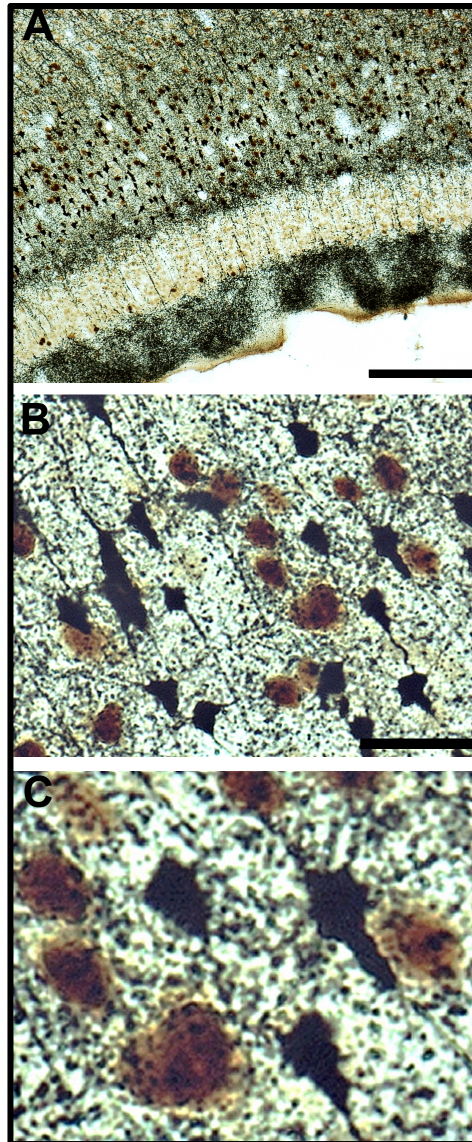


Figura 18: Doble tinción de la inmunomarcación contra la proteína FosB/ Δ FosB y A-Cu-Ag revela la colocación de la inducción de FosB/ Δ FosB y terminales argirofílicas en la corteza retrosplenial granular (RSG). Ratas macho ORQ tratados con MK801 (10mg/kg) y tres días de sobrevida revelados con inmunohistoquímica contra la proteína FosB/ Δ FosB y la técnica A-Cu-Ag para revelar terminales argirofílicas. (A) Microfotografía de la RSG (lat. 1,4 mm) a bajo aumento revela que la inmunomarca no interfiere con las marca de la A-Cu-G, destacando somas argirofílicos y neuronas FosB/ Δ FosB positivas en la capa IV, dejando la capa II-III libre, y la capa I con una densa marcación argirofílica de terminales. (B) Aumento de una porción de la capa IV de la RSG donde se puede apreciar que no hay colocación de FosB/ Δ FosB y somas argirofílicos, sin embargo a mayor aumento (C) se pueden observar terminales que colocan en algunas neuronas FosB/ Δ FosB positivas.

Estos resultados apoyarían la hipótesis de que la prolongación de la transcripción de GETs sirve como un marcador de lesión cerebral excitotóxica y que pueden desempeñar un papel en la neurodegeneración y/o neuroprotección, o tal vez en la reorganización sináptica de las poblaciones neuronales en donde ellas se expresan.

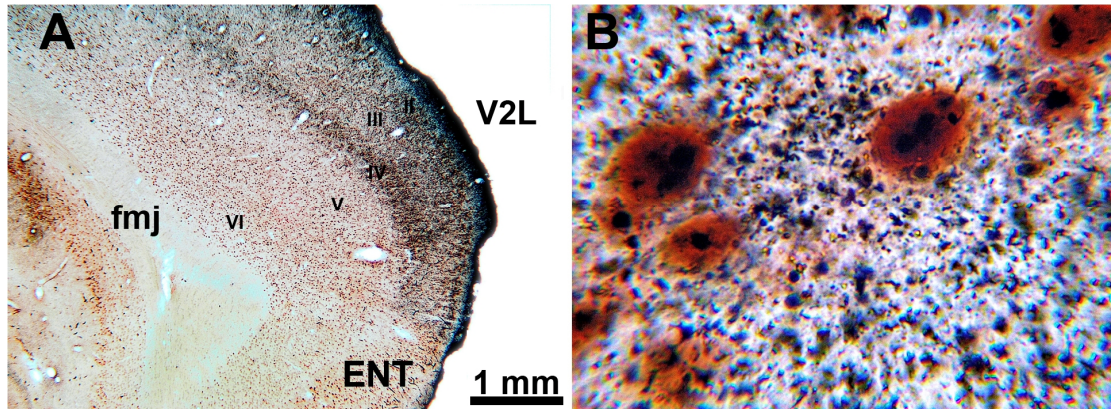


Figura 19: Doble marcación de FosB/ Δ FosB y A-Cu-Ag revela la colocalización de la inducción de FosB/ Δ FosB y terminales argirofílicas en la corteza visual secundaria (V2L). Ratas macho ORQ tratados con MK801 (10 mg/kg) y tres días de sobrevivencia revelados con inmunohistoquímica contra la proteína FosB/ Δ FosB y la técnica A-Cu-Ag. **(A)** Microfotografía de la V2L (lat. 4,0 mm) a bajo aumento (25X) revela que el incremento de la inmunomarca de FosB/ Δ FosB positivas en la capa IV coincide con una densa marcación argirofílica de terminales. **(B)** Aumento (1000X) de una porción de la capa IV de la V2L donde se puede apreciar que las terminales argirofílicas se colocalizan con la inmunomarca de FosB/ Δ FosB.

2.3 Efecto del tratamiento de una dosis aguda neurotóxica de MK801 sobre la expresión de proteínas EGR-1 en diferentes estructuras de la amígdala extendida y de la corteza

Similar a c-Fos, el “early growth response 1” (EGR-1 o también denominado zif 268, Krox-24 y NGFI-A) es otro GET que ha sido extensamente empleado para estudiar respuestas neuronales a estímulos sensoriales. A diferencia de c-Fos que tiene una expresión constitutiva prácticamente nula, EGR-1 tiene una expresión basal que puede incrementarse o reducirse en función del tipo de estimulación recibida (23). Se considera que los productos de expresión de EGR-1 estarían relacionados con la actividad sináptica normal o ligados a procesos de aprendizaje y plasticidad (130). Por otro lado, se han observado cambios en la expresión de EGR-1 en respuesta a drogas de abuso (232) y en procesos de neurotoxicidad (245). A fin de identificar las estructuras corticales y

amigdalinas afectadas por la toxicidad de antagonistas NMDA, se analizó la inmunorreactividad a EGR-1 luego de 3 días de la administración de MK801 (10 mg/kg).

En machos controles (salina) se observó una expresión basal de EGR-1 confinada exclusivamente al núcleo celular. Abundante cantidad de neuronas inmunorreactivas a EGR-1 se manifestaron en muchas estructuras cerebrales, particularmente en las capas II, III, IV y VI de las cortezas RSG, RSD, V2MM y V2L, y las capas III, V y VI de la corteza ENT (Figura 20 A). En los núcleos amigdalinos Me, MEPV, BSTM, BSTS, BSTL, CeL, y CeM se reveló una marca basal moderada, mientras que en la amígdala basolateral se observó una inmunorreactividad a EGR-1 mas intensa.

A diferencia de lo observado con c-Fos, el tratamiento con MK801 no indujo cambios apreciables en la expresión de EGR-1 en áreas corticales ó amigdalinas de la rata macho entero, con la notable excepción de la capa IV de la corteza RSG donde se observó una dramática reducción de la cantidad de neuronas EGR-1 positivas (Figura 20 A-B). Un detallado análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a EGR-1 en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas confirmó un efecto significativo del tratamiento con MK801. El ANOVA de dos vías (tratamiento x área) reveló un efecto significativo del tratamiento con MK801 ($F_{[1,6]} = 4,12$; $p < 0,088$); del área analizada ($F_{[11,66]} = 6,57$; $p < 0,0000$), y de la interacción entre el tratamiento y área ($F_{[11,66]} = 19$; $p < 0,028$). El test *post hoc* de Newman Keuls reveló el significativo decremento del numero de neuronas EGR-1 positivas en la capa IV de la RSG debido al tratamiento con MK801 ($p < 0,028$), (Figura 20 E). Estas observaciones llamativamente coinciden con la sistemática presencia de somas degenerativos confinados exclusivamente en esa estructura cortical (Figura 20 A, B y C).

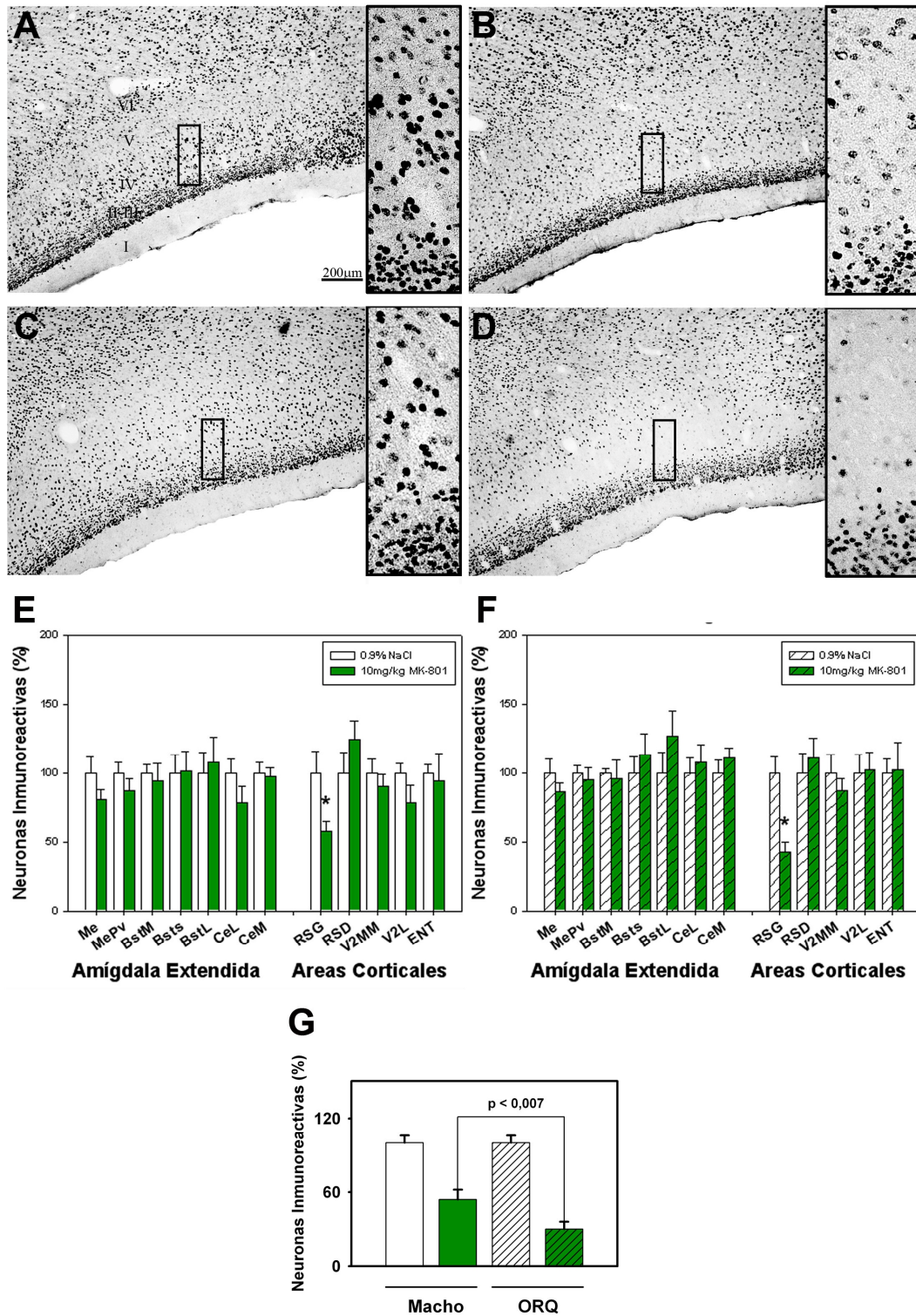


Figura 20: Comparación de la inducción de EGR-1 entre machos enteros y ORQ en diferentes áreas corticales sensibles a los efectos neurotóxicos de MK801. Se analizó la inmunorreactividad a EGR-1 luego de 3 días de la administración de una sola dosis de salina (CINa 0,9%) o de MK801 (10 mg/kg) en ratas macho enteros (A-B) y ORQ (C-D). Fotomicrografía de la inmunorreactividad de EGR-1 en la corteza retrosplenial granular (RSG) de macho enteros tratados con salina (A) y MK801 (B). En el recuadro la ampliación (400x) de los somas de la capa IV de la RSG muestra la clara supresión de la marca de EGR-1. De manera semejante se analizó la inmunorreactividad de EGR-1 en animales ORQ tratados con salina (C) y MK801 (D). Los

resultados muestran que en ORQ controles (**C**), la cantidad y distribución de neuronas EGR-1 es similar a la de los machos enteros (**A**), indicando que la orquiectomía no afecta la expresión basal de EGR-1. En el ORQ tratado con MK801 (**D**) se puede apreciar la marcada supresión de EGR-1. (**E**) Un análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a EGR-1 en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas de la rata macho entero reveló un efecto significativo del MK801. Un ANOVA de dos vías (tratamiento x área) reveló un efecto significativo del tratamiento de MK801 ($F_{[1,6]} = 4,12$; $p < 0,088$); del área $F_{[11,66]} = 6,57$; $p < 0,0000$ y de la interacción entre el tratamiento y área $F_{[11,66]} = 19$; $p < 0,028$. El test *post hoc* de Newman Keuls confirmó una significativa supresión del número de neuronas EGR-1 positivas en la capa IV de la RSG ($p < 0,028$). (**F**) Análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a EGR-1 en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas del ORQ reveló un efecto significativo del MK801. El ANOVA de dos vías (tratamiento x área) reveló un efecto significativo del tratamiento $F_{[1,6]} = 11,26$; $p < 0,0153$; del área $F_{[11,66]} = 7,93$; $p < 0,0000$; y de la interacción tratamiento y área $F_{[11,66]} = 2,10$; $p < 0,0321$. El test *post hoc* confirmó la supresión significativa de neuronas EGR-1 positivas en la capa IV de RSG ($p < 0,0321$). (**G**) Comparación estadística del número de neuronas EGR-1 en la capa IV de RSG en los machos ORQ respecto de los machos enteros. El ANOVA de dos vías (tratamiento x sexo) reveló un efecto significativo del tratamiento $F_{[1,12]} = 91,18$; $p < 0,00001$; del sexo $F_{[1,12]} = 20,74$; $p < 0,0006$; y de la interacción $F_{[1,12]} = 3,64$, $p < 0,0803$. Test *post hoc* reveló una reducción significativamente mayor de neuronas EGR-1 positivas en la capa IV de RSG del ORQ ($p < 0,0007$).

A fin de analizar la correlación inversa entre degeneración neuronal y la inmunorreactividad de EGR-1, el efecto de MK801 fue analizado en los machos ORQ. Los resultados muestran que en los ORQ controles la cantidad y distribución de neuronas EGR-1 es similar a la de los machos enteros indicando que la orquiectomía no afecta la expresión basal de EGR-1. Así también se reveló un efecto de MK801 restringido a la capa IV de la corteza RSG (Figura 20 C y D). El ANOVA de dos vías (tratamiento x área) reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{[1,6]} = 11,26$; $p < 0,0153$); del área ($F_{[11,66]} = 7,93$; $p < 0,0000$); y de la interacción entre el tratamiento y el área ($F_{[11,66]} = 2,10$; $p < 0,0321$). El test *post hoc* de Newman Keuls confirmó la supresión significativa de neuronas EGR-1 positivas en la capa IV de RSG de los ORQ ($p < 0,0321$) (Figura 20 F). Una comparación estadística del número de neuronas EGR-1 en la capa IV de RSG mostró una reducción significativamente mayor en los machos ORQ respecto de los machos enteros. El ANOVA de dos vías (tratamiento x sexo) reveló un efecto significativo del tratamiento de MK801 ($F_{[1,12]} = 91,18$; $p < 0,00001$) de la orquiectomía ($F_{[1,12]} = 20,74$; $p < 0,0006$) y de la interacción entre el tratamiento y la orquiectomía ($F_{[1,12]} = 3,64$, $p < 0,0803$) en la RSG. El test *post hoc* de Newman Keuls reveló que la supresión de la marca de EGR-1 en la RSG de los machos ORQ era significativamente mayor que los machos enteros ($p < 0,0007$) (Figura 20 G). Estos resultados muestran que la degeneración neuronal se correlaciona inversamente con la expresión de EGR-1 en la

capa IV de la RSG, sugiriendo que la reducción en la expresión de EGR-1 podría estar ligada a la muerte neuronal (Figura 21).

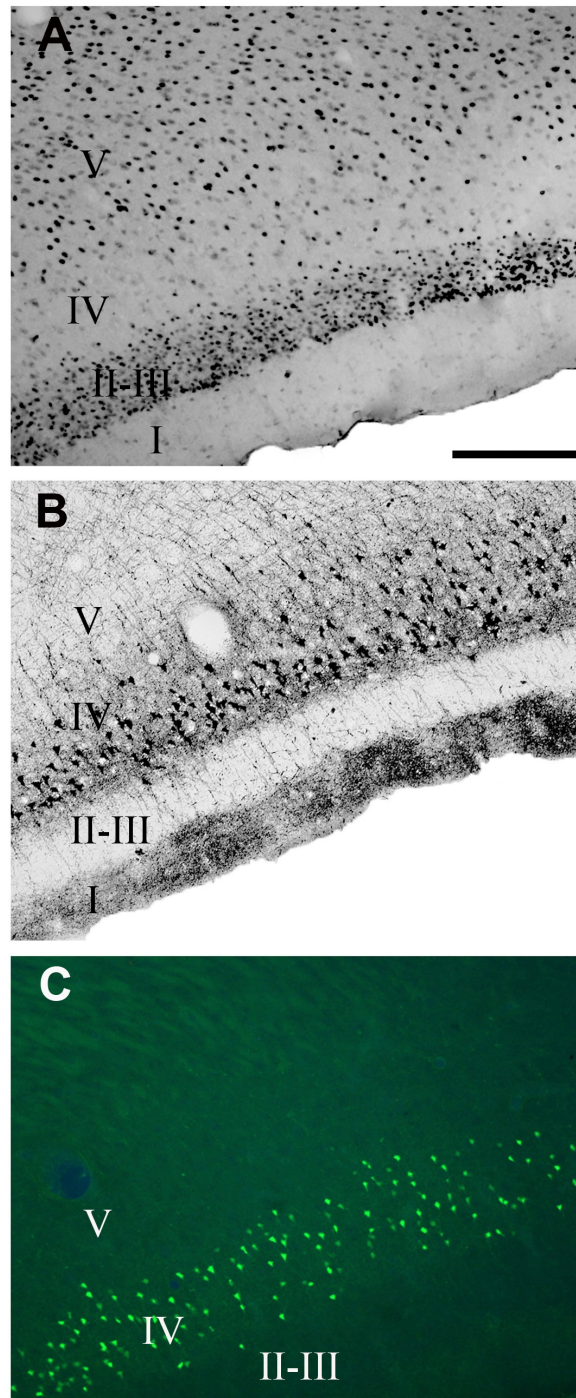


Figura 21: La degeneración neuronal se correlaciona inversamente con la expresión de EGR-1 en la capa IV de la corteza retrosplenial granular (RSG). Fotomicrografía (100X) de cortes sagitales seriados de la RSG (lat. 1,3 mm) de ratas ORQ tratados con MK801 (10mg/kg) y tres días de sobrevida revelados con inmunohistoquímica contra la proteína EGR-1(A), la técnica A-Cu-Ag (B) y la técnica FJB(C). Se destaca la ausencia de la inmunomarca de la proteína EGR-1 en la capa IV de RSG, sin embargo ambas técnicas de detección de muerte neuronal A-Cu-Ag y FJB, revelan en esa misma región una cantidad significativa de degeneración.

3) ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS INDUCIDOS POR EL EFECTO NEUROTÓXICO DE MK801

Determinación de subpoblaciones de neuronas que contienen proteínas fijadoras de calcio

La especificidad de la muerte neuronal y de la inmunoreactividad de las subpoblaciones neuronales sugería que ciertos fenotipos celulares podrían ser particularmente sensibles al efecto neurotóxico de MK801. Por lo tanto, era de gran interés identificar el fenotipo de las poblaciones neuronales que presentaban alteraciones tanto neurotóxicas, como de cambios de neuroplasticidad prolongados revelados por los GETs. Los A-NMDA bloquean el canal de Ca^{+2} , impidiendo el ingreso de los iones al interior de la neurona. El Ca^{+2} es un regulador de una variedad de funciones de las neuronas, como excitabilidad, liberación de neurotransmisores, transcripción de genes y muerte celular. Las concentraciones dentro del citosol deben estar minuciosamente controladas para permitir el correcto funcionamiento de la célula. Una variedad de proteínas de superficie y citosólicas regulan las concentraciones de Ca^{+2} , y se conocen como proteínas ligadas al Ca^{+2} (CaBP). Estas proteínas, como calretinina (CR) y parvalbumina (PV), entre otras, tienen un bajo peso molecular y actuarían a modo de buffer endógeno de calcio. Estas CaBP colocalizan dentro de subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas y por ende el estudio de su distribución se utiliza para comprender la organización de circuitos inhibitorios en diferentes regiones del cerebro (128). Los siguientes experimentos se realizaron a fin de caracterizar el fenotipo celular afectado por la neurotoxicidad inducida por MK801, para poder determinar si algún mecanismo inhibitorio queda perturbado de manera prolongada.

3.1 Efecto del tratamiento de una dosis aguda de MK801 sobre la expresión de CaBP: análisis de calretinina y parvalbumina

En machos controles (salina) se realizó la caracterización de las células CR positivas identificando neuronas con una fuerte inmunoreactividad puntiforme en el citosol, marcando todo el soma, con dendritas y neuropilo. Una gran cantidad de neuronas manifestaban un soma multipolar con 2 o más dendritas, las cuales se diferenciaban en dos grupos de células. En el primer grupo, el soma era angular con 2 a 3 dendritas varicosas, con pocas ramificaciones. El otro grupo de neuronas presentaba

somas esféricos con 7 o más dendritas, de las cuales una dendrita era muy gruesa y oscura, mientras que las otras eran más claras y finas. Una considerable cantidad de neuronas inmunorreactivas a CR se manifestaron en numerosas estructuras cerebrales, particularmente en los núcleos amigdalinos analizados: Me, MEPV, BSTM, BSTS, BSTL, CeL, y CeM (Figura 22 A y B), donde se reveló un marca basal moderada con una cuantiosa cantidad de neuropilo y terminales. En la corteza, más específicamente en RSG, RSD, V2MM y V2L se observaban neuronas CR positivas dispersas en todas las capas corticales, salvo la capa I, con escasa coloración del neuropilo. En la corteza ENT, especialmente en el campo entorhinal dorsal intermedio, una abundante cantidad de neuronas y neuropilo se reveló en las capas III, V y VI, dejando la capa IV prácticamente libre y solo unas pocas neuronas aisladas en las capa I y II (Figura 22 C y D).

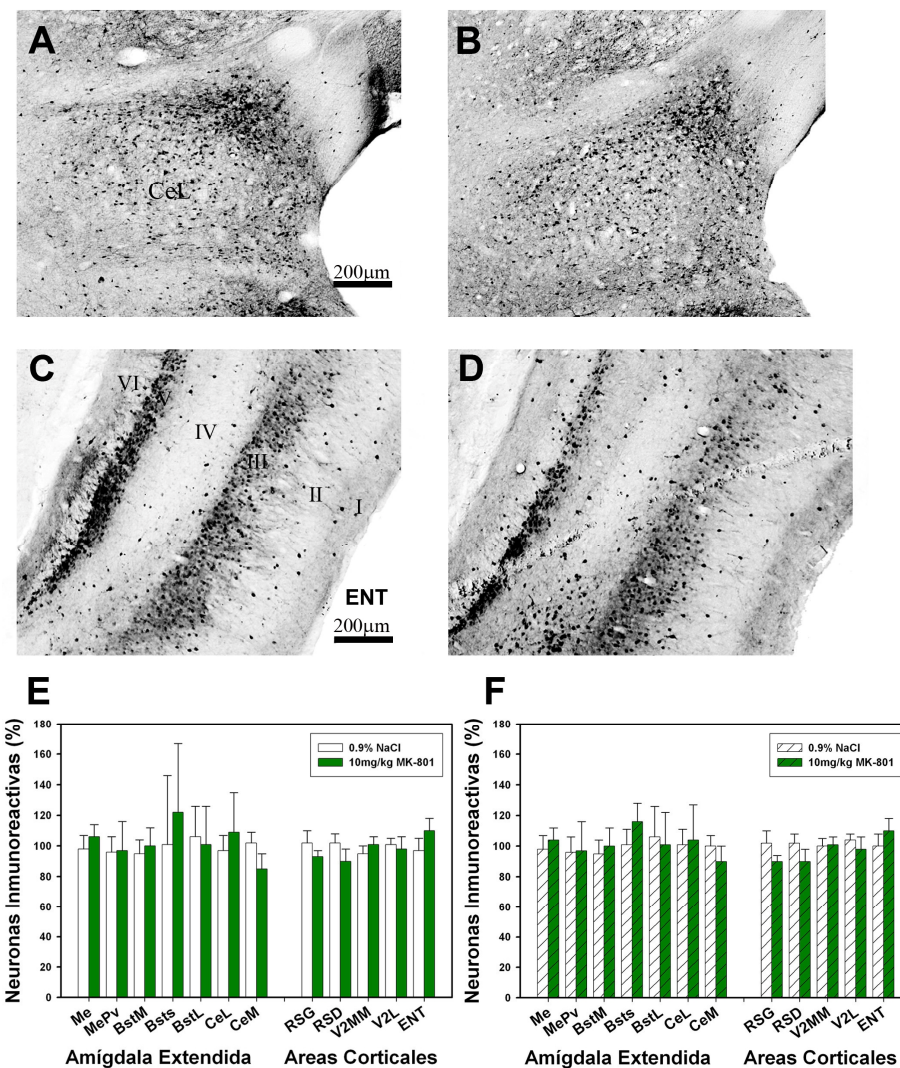


Figura 22: Efecto del tratamiento de una dosis aguda de MK801 (10 mg/kg) sobre la expresión de la proteína ligada al calcio, Calretinina (CR). Se analizó la inmunoreactividad de CR luego

de 3 días de la administración de una sola dosis de CINA 0,9% o de MK801 (10 mg/kg) en ratas macho enteras y ORQ. Fotomicrografía de bajo aumento (50X) de la inmunorreactividad de CR en amígdala central lateral (CeL) (lat. 4,2 mm) de ratas macho enteras tratadas con salina (**A**) y MK801 (**B**). Fotomicrografía de bajo aumento (50X) de la inmunorreactividad de CR en la corteza entorhinal (ENT) (lat. 4,0 mm) de ratas macho tratados con salina (**C**) y MK801 (**D**). (**E**) Análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a CR en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas en ratas macho enteras. El análisis estadístico confirmó que el tratamiento con MK801 no indujo cambios significativos en la expresión de CR en áreas corticales o amigdalinas. (**F**) Análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a CR en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas en ratas ORQ. El análisis estadístico confirmó que el tratamiento con MK801 no indujo cambios significativos en la expresión de CR en áreas corticales o amigdalinas de los animales ORQ.

A diferencia de lo observado con los GET, el tratamiento con MK801 no indujo cambios apreciables en la expresión de CR en áreas corticales o amigdalinas (Figura 22 B y D). Un detallado análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a CR en las diferentes estructuras corticales y amigdalinas confirmó que no hubo un efecto significativo en ninguna de las estructuras analizadas (Figura 22 E). A fin de analizar si un aumento de la degeneración inducida por MK801 podría afectar la expresión de CR, se cuantificó en machos ORQ el número de neuronas CR positivas. El análisis demostró que aumentar el número de neuronas muertas no alteraba significativamente la expresión de CR, indicando que podría ser otro fenotipo celular el que estaría sufriendo la muerte celular (Figura 22 F).

La inmunomarca de PV consistió en la tinción de somas con dendritas y axones, de los cuales una cantidad considerable presentó un cuerpo de tamaño mediano, o grande, multipolar, con dendritas varicosas de diferentes espesores. Se distinguieron 3 tipos de células de acuerdo al tamaño y a la forma. El primer tipo revelaba un soma pequeño, esférico con 3-5 dendritas. El segundo tipo de neuronas presentaba somas medianos a grandes, multipolares, con dendritas de diferentes espesores. Por último, el tercer grupo, consistía en somas fusiformes con 2 polos dendríticos cortos y gruesos. La inmunorreactividad de neuronas PV positivas se distribuía en toda la corteza cerebral, hipocampo, capa superficial del bulbo olfativo, núcleo talámico reticular, globo pálido y sustancia nigra. Dentro de las áreas corticales, la corteza somatosensorial, visual, auditiva y de asociación exhibían mayor cantidad de células inmunorreactivas a PV que la corteza motora. La distribución de células PV positivas se encontraban dispersas en diferentes capas corticales en donde la mayoría de las neuronas se encontraban orientadas verticalmente a la superficie del cerebro, con excepción de la capa I, que es PV negativa. Un análisis semi-cuantitativo reveló que existían diferencias en el número de PV

positivas entre las capas (ANOVA, $F_{[4,20]} = 16,92$; $p < 0,0000$), mostrando un incremento paulatino en el número de neuronas PV positivas desde la capa II hacia la capa IV, que luego disminuía hacia la capa VI, coincidiendo con un estudio previo de Van Brederode y col (249). Este mismo patrón se podía observar en la RSG, RSD y ENT. Sin embargo, los núcleos amigdalinos analizados en este trabajo, CeL y CeM, Me, MEPV, BSTS y en sus respectivos núcleos rostrales, BSTL y BSTM, no presentaban marca positiva para PV. Estos datos coinciden con el estudio de Kemppainen y Pitkanen (128) sobre la distribución de CaBP en el complejo amigdalino de la rata, en donde no se observan neuronas PV inmunorreactivas en los núcleos amigdalinos central y medial.

Dada la distribución de células PV positivas en las estructuras de interés de este trabajo, el análisis semicuantitativo del número de neuronas PV positivas se realizó sólo en las áreas corticales RSG, RSD, V2MM, V2L y ENT. A fin de analizar si un aumento de la degeneración inducida por MK801 podría afectar la expresión de PV, se cuantificó en machos ORQ el número de neuronas PV positivas. El análisis cuantitativo del número de neuronas inmunorreactivas a PV en las diferentes estructuras corticales confirmó que no hubo un efecto significativo del tratamiento con MK801 ($F_{[1,4]} = 0,009$; $p < 927$) en ninguna de las estructuras analizadas (ANOVA de dos vías, tratamiento x área, $F_{[4,16]} = 0,48$; $p < 0,7469$).

Para corroborar que la muerte neuronal inducida por MK801 no afectaba directamente a las neuronas CR y PV positivas, se realizó una doble marca de CR y PV con la técnica A-Cu-AG. Tanto en RSG como en ENT (Figura 23 A y B) de machos ORQ, donde había una gran cantidad de neuronas argirofílicas, no se reveló ninguna doble marca. Esto podría deberse a que los depósitos de nitrato de plata interferían con la reacción inmunohistoquímica. Para sortear este obstáculo se realizó una triple marca fluorescente con FJB, PV y Hoechst (Figura 24). La observación con el microscopio de fluorescencia confirmó los resultados revelados con la A-Cu-Ag, demostrando que no había colocalización de la neurodegeneración y células PV positivas (Figura 24).

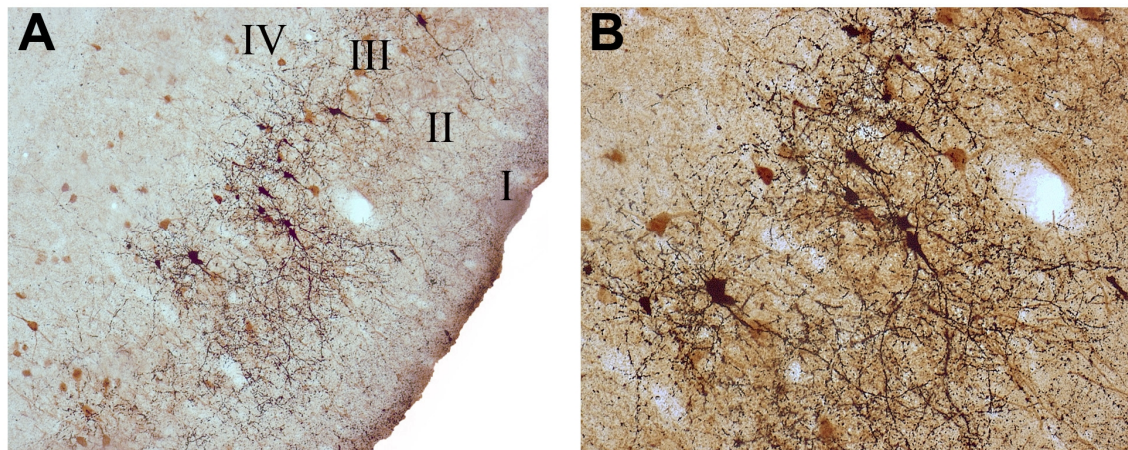


Figura 23: La degeneración neuronal inducida por MK801 revelada por la A-Cu-Ag no presenta colocalización con neuronas parvalbúmina (PV) positivas. Fotomicrografía de bajo (100X) **(A)** y de mas alto aumento (200X) **(B)** de cortes sagitales de la corteza entorhinal (ENT) (lat. 4,0 mm) de un macho ORQ tratado con MK801 (10mg/kg) y tres días de sobrevida revelado con la técnica inmunohistoquímica contra la proteína PV y la técnica para revelar neurodegeneración, A-Cu-Ag. No se observa doble marca de neuronas argirofílicas y PV positivas.

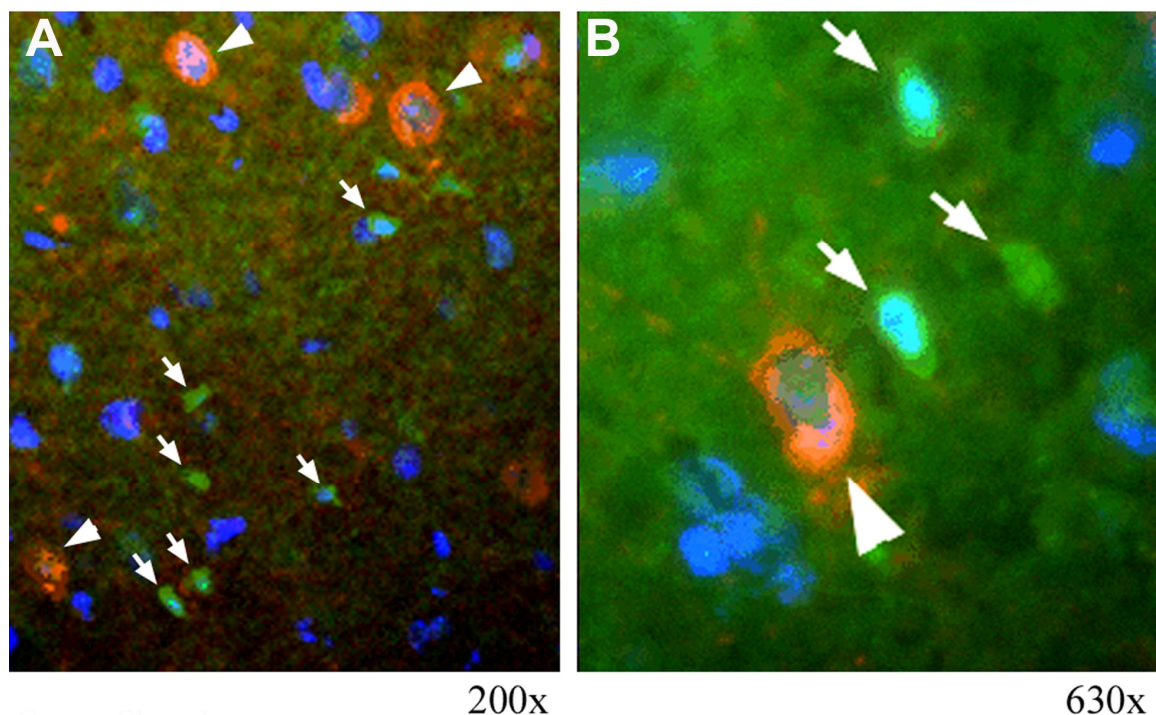


Figura 24: La degeneración neuronal inducida por MK801 revelada por FJB e inmunofluorescencia contra parvalbumina (PV) no presenta colocalización. Fotomicrografía de bajo **(A)** y alto aumento **(B)** de cortes sagitales de la corteza retrosplenial granular (RSG) (lat. 1,4 mm) de un ORQ tratado con MK801 (10mg/kg) y tres días de sobrevida revelado con: Hoechst, para marcar los núcleos neuronales (azul), la técnica de inmunofluorescencia contra la proteína PV (rojo), y la técnica para revelar neurodegeneración FJB (verde). Se revela la colocalización de núcleos tenidos con Hoechst y neuronas PV positivas (punta de flecha blanca) y núcleos tenidos con Hoechst y neuronas degeneradas marcadas con FJB (flechas blancas) No se observa doble marca de neuronas degeneradas marcados por FJB y PV positivas.

Para estudiar si las neuronas con marcación prolongada de FosB/ Δ FosB colocalizaban con las CaBP, se realizó una doble inmunomarca de las proteínas FosB/ Δ FosB y PV (Figura 25 A y B). Posteriormente se realizó un análisis semi-cuantitativo de la marcación en diferentes capas de V2L, debido a la significativa sensibilidad de ésta área a los efectos de MK801 sobre la expresión de FosB/ Δ FosB tanto en machos enteros como en ORQ. El ANOVA de dos vías (tratamiento x capa cortical) reveló que la capa cortical demostraba una diferencia significativa en el número de células con doble marca de FosB/PV entre capas ($F_{[4,20]} = 16,04$; $p < 0,00001$), sin embargo el tratamiento ($F_{[1,5]} = 11,95$; $p < 0,84$) y la interacción entre tratamiento y capa ($F_{[4,20]} = 0,64$; $p < 0,6403$) reveló que los animales tratados con MK801 no presentaban una diferencia significativa con respecto a los controles en el número de células con doble marca de FosB/PV. Considerando que no hubo disminución significativa del número de células totales PV positivas entre animales tratados con salina y animales tratados con MK801, estas observaciones en conjunto indican que la doble marca basal de la capa IV de V2L es significativa con respecto a las otras capa corticales y además que el tratamiento de MK801 no modifica la cantidad de células con doble marca FosB/PV positivas.

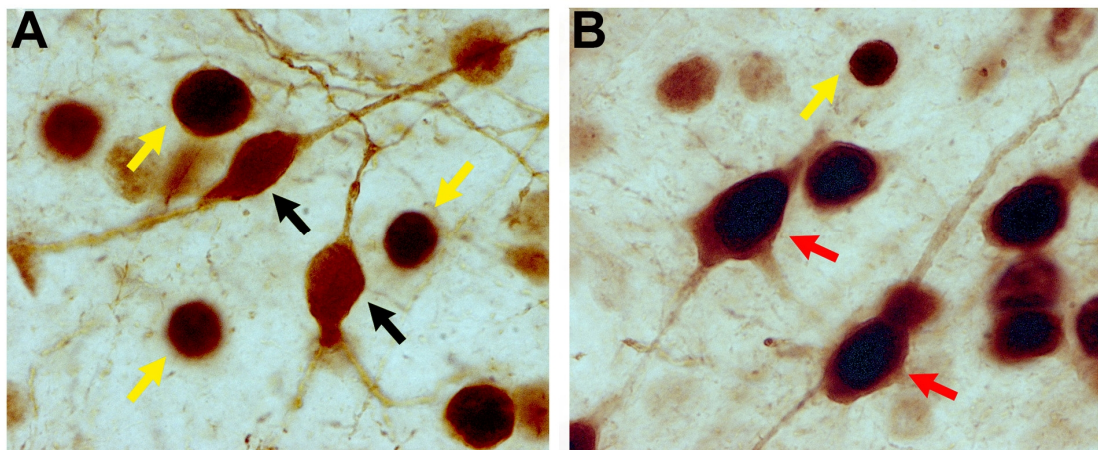


Figura 25: Doble inmunohistoquímica contra proteínas FosB/ Δ FosB y parvalbumina (PV) revela colocalización en la capa IV de la corteza visual secundaria lateral (V2L). Fotomicrografía de alto aumento (1000X) de cortes sagitales de V2L (lat. 4,0 mm) de una rata macho ORQ tratado con MK801 (10mg/kg) y tres días de sobriedad, revelado con la técnica inmunohistoquímica contra la proteína PV (marrón) y FosB/ Δ FosB (negro). Se observó neuronas PV positivas (flechas negras) y FosB/ Δ FosB positivas (flechas amarillas) en la capa cortical III de V2L. En la capa cortical IV de V2L se reveló un aumento en la cantidad de células con doble marca de PV y FosB/ Δ FosB (flechas rojas).

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

1) ANÁLISIS NEUROANATÓMICO DE LA DEGENERACIÓN NEURONAL INDUCIDA POR MK801

Aspectos técnicos de la determinación de degeneración neuronal

Identificar en forma selectiva las neuronas que se encuentran en procesos de degeneración irreversible representa un importante desafío aún en el presente. Por más de 100 años, para marcar neuronas en proceso de degeneración se ha utilizado la impregnación argéntica del tejido nervioso, lo que permite distinguir características morfológicas de las neuronas que sufren daños. La técnica pionera de Bielchowsky (1904) (24) utiliza la impregnación argéntica para teñir diferentes tipos de células y procesos neuronales tanto normales como anómalos. En el presente, esta técnica aún se aplica para identificar características irregulares que pueden presentarse en diversas patologías. Sin embargo, a lo largo de los años, fueron perfeccionados los métodos para disminuir la señal del tejido normal y contrastar los procesos degenerativos. Así fue que la técnica de Bielchowsky ha sufrido diversas modificaciones, incluyendo las de Glee (1946) (90), Nauta y Gyax (1951) (184) y luego, la primera versión de la técnica de cobre y plata (cupro-argéntica) de Olmos (1969) (52) y sus posteriores modificaciones de Olmos e Ingram (1972) (59) y de Olmos y col. (1981, 1994) (57, 58). El factor común de todas estas técnicas fue el pre-tratamiento con diversas soluciones previo a la exposición del tejido a las soluciones argénticas. El resultado era la supresión de la impregnación de las fibras normales y una impregnación intensa de los axones degenerados. La técnica argéntica utilizada en este estudio, llamada Amino-Cupro-Argéntica (A-Cu-Ag) (57), es la última modificación de los métodos cupro-argénticos desarrollados para la tinción selectiva de la degeneración neuronal. Trabajos previos han demostrado que esta última versión es más sensible que las anteriores para revelar los cambios neurodegenerativos inducidos por diferentes tipos de injuria (25, 57; 26) (Figura 26 A, B, C, D). Comparada con las versiones anteriores, la A-Cu-Ag es menos elaborada, puede ser aplicada a mayor escala y genera resultados más reproducibles. El aumento del contraste de la expresión argirofílica de los procesos degenerativos, tanto somáticos como de terminales, permite observar el cuadro neurodegenerativo aún con objetivos de bajo aumento siendo ideal para la descripción neuroanatómica completa de estructuras cerebrales involucradas en la respuesta a diferentes agentes que causan daño neurodegenerativo irreversible.

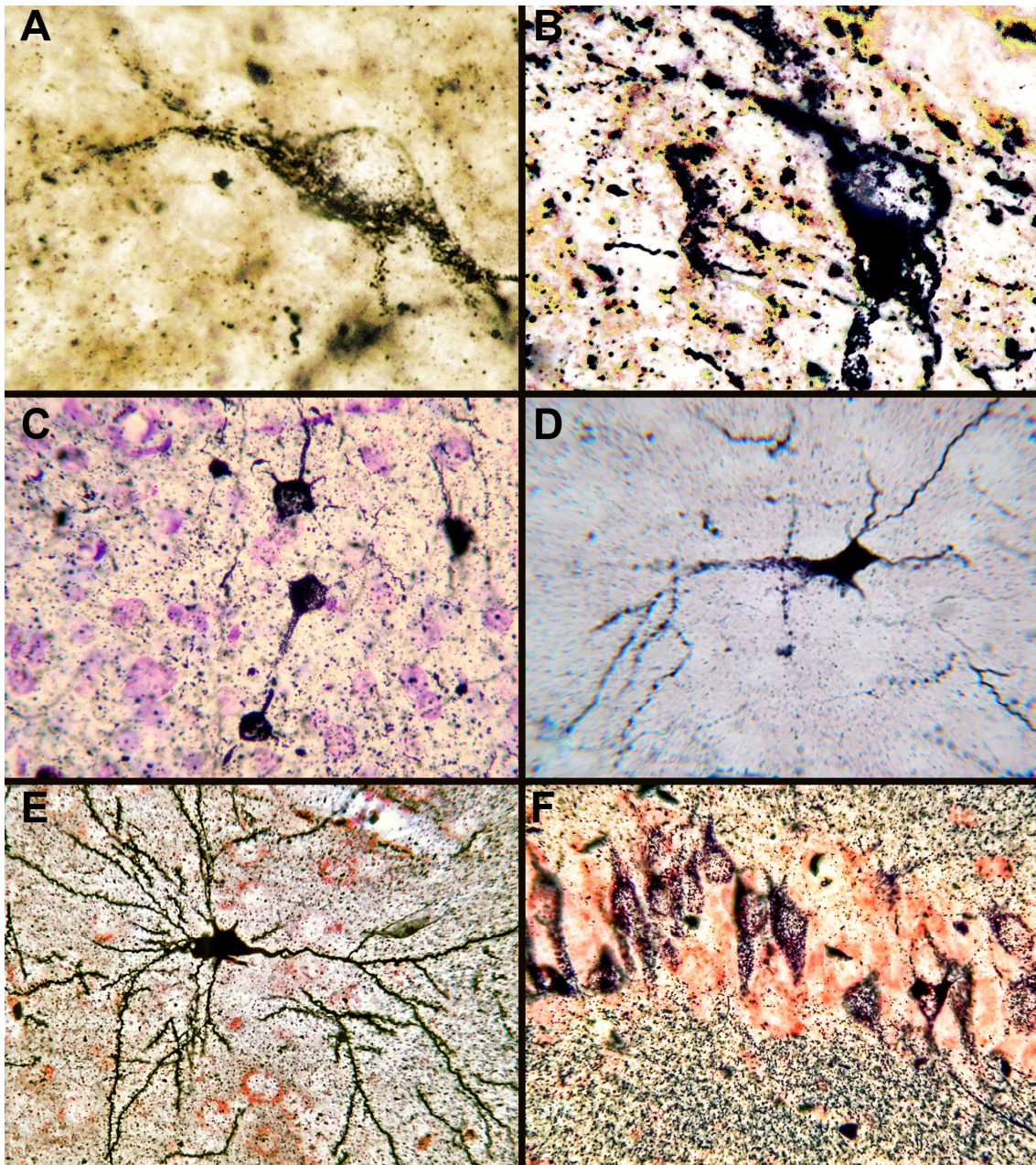


Figura 26: Ilustración de neuronas argirofílicas normales frente a neuronas en diferentes condiciones de excitotoxicidad teñidas con la técnica Amino-Cupro Argentina (A-Cu-Ag). **(A)** Ilustración de los depósitos de sales de plata en la perikarya, dendritas y axones de neuronas granulares argirofílicas teñidas con la técnica A-Cu-Ag en el hipotálamo lateral de ratas normales. **(B-E)** Fotomicrografías a gran aumento de diferentes expresiones de los cambios degenerativos teñidos con la A-Cu-Ag y contrateñidos con la técnica de Nissl (en rojo o azul) en neuronas de ratas Wistar expuestas a: **(B y C)** microinyecciones intracerebrales de doxorubicina (DXA, 0,3 μ l/2,5%); **(D)** administración i.p. de MK801 (10 mg/kg); **(E)** microinyecciones intracerebrales de ácido quinolinico (QA, 60nmol/0,5 μ l) y **(F)** administración i.p. de trimetiltilin (TMT, 8mg/kg). Se puede apreciar que el tratamiento de DXA y TMT muestra depósitos granulares de plata en su perikarya y en las dendritas proximales, mientras que las neuronas bajo el efecto de QA o MK801 revelan somas neuronales con apariencia no granulares, completamente negras, que probablemente correspondan a un desarrollo agudo de neurotoxicidad, en contraste con el proceso semiagudo de DXA y TMT.

Es importante destacar que la técnica puede combinarse con otras técnicas histoquímicas (ej., Nissl), lo cual permite estudiar con mayor precisión el área del SNC afectada. En años más recientes otras técnicas no basadas en precipitados de plata han sido desarrolladas, entre ellas el Fluoro-Jade B (FJB) que, al igual que su predecesor Fluoro-Jade, es un derivado aniónico de fluoresceína. Se ha demostrado que el FJB es útil para el estudio histológico de la tinción de neuronas en degeneración (219, 220) ya que tiene una mayor afinidad que el Fluoro Jade, lo que mejora la relación señal/ruido, permitiendo una más fácil detección y documentación de las neuronas degenerativas. Debido a la simpleza y fiabilidad, la técnica de FJB ha estado ganando popularidad para estudiar diferentes paradigmas de neurotoxicidad, sin embargo la técnica es incapaz de revelar el cuadro de neurotoxicidad con detalle morfológico suficiente para poner de manifiesto procesos de degeneración terminal. Esta observación no es menor ya que es la degeneración de terminales la que permite establecer relaciones anatómicas entre las diferentes estructuras interconectadas en un proceso neurodegenerativo.

Los primeros trabajos realizados sobre los cambios neurotóxicos que inducen los A-NMDA, como PCP, ketamina y MK801, revelaron el proceso neurodegenerativo mediante tinciones no selectivas para neuronas en degeneración como lo es la tinción con hematoxilina eosina. Los estudios enfocaron el análisis exclusivamente en RSG sin poder precisar si el patrón observado corresponde a estrés neuronal transitorio o un proceso degenerativo irreversible (15, 44, 74-76, 194, 195). Luego, utilizando técnicas inmunohistoquímicas contra diversos marcadores de estrés neuronal, como HSP 70 y HSP 72 (44, 226, 227, 182, 183) ó GFAP (75, 76, 111, 182, 183), se demostró que otras regiones del SNC, tales como la ENT, CA1, DG y PIR, revelaban alteraciones inducidas por los A-NMDA. Paralelamente diversos laboratorios, incluyendo el nuestro, comenzaron a utilizar los métodos cupro-argénticos (57, 58) para evaluar la degeneración neuronal. En el presente trabajo, para la tinción selectiva de la degeneración neuronal inducida por MK801 se utilizaron las técnicas A-Cu-Ag y FJB. Mediante el empleo de FJB se observó degeneración somática confinada a la capa IV de la RSG, en forma completamente coincidente con la técnica A-Cu-Ag. Sin embargo, la degeneración tipo apoptótica del bulbo olfatorio revelada con la técnica A-Cu-Ag no fue puesta de manifiesto por la técnica de FJB. Así, la degeneración terminal claramente destacada por la A-Cu-Ag en diversas áreas cerebrales, no pudo ser puesta de manifiesto con el FJB. Más aún, el análisis del curso temporal de neurodegeneración pone de manifiesto que, comparada con los métodos alternativos como el FJB, la tinción cupro-argéntica resulta

ser la más adecuada y sensible para seguir el proceso neurodegenerativo a través del tiempo. Así, en este trabajo nos fue posible observar con la técnica A-Cu-Ag que 24 hs luego del tratamiento con MK801 grupos neuronales en la capa IV de la RSG adquieren una intensa argirofilia que asemeja una tinción de tipo-Golgi, con el soma y arborizaciones dendríticas con morfología normal muy bien preservadas, sin embargo ya evidencian alteraciones morfológicas en su axón que adquiere una apariencia de tirabuzón. Esta morfología fue seguida en el tiempo (48-72hs) por la fragmentación gradual de los procesos axonales, y luego la distorsión y encogimiento de los cuerpos celulares, demostrando signos convincentes de muerte neuronal. Esta conclusión se ve reforzada por observaciones previas que mediante el empleo de microscopía electrónica se corroboró, a nivel ultraestructural, la muerte revelada por las técnicas cupro-argénticas en la neurodegeneración inducida por MK801 en diferentes áreas del cerebro (74, 113, 276, 283). Además, esos estudios confirmaron a nivel ultraestructural tanto la muerte somática, como los cambios patológicos en áreas con degeneración terminal, revelando membranas concéntricas y acumulación de desechos de partículas, sugiriendo una degeneración progresiva de los elementos dendríticos. También mostraron una coincidencia notable con la técnica A-Cu-Ag en la detección de la muerte neuronal tipo apoptótica y no apoptótica inducida por MK801 en las diferentes estructuras cerebrales. En conjunto estos datos apoyaron fuertemente el uso de las A-Cu-Ag para el estudio de los cambios neurodegenerativos permanentes inducidos por MK801 en diferentes regiones cerebrales. En base a todas estas consideraciones, en este trabajo el análisis de los procesos neurodegenerativos se realizó fundamentalmente con la técnica A-Cu-Ag, empleándose como método complementario la técnica FJB.

Efectos sexualmente dimórficos e influencia de las hormonas gonadales en la degeneración neuronal inducida por MK801 en la corteza retrosplenial granular de la rata

El presente estudio reveló que los andrógenos reducen significativamente el efecto neurotóxico de MK801 en la capa IV de RSG, mientras que los estrógenos contrarrestan este efecto. Las diferencias sexuales frente a la neurotoxicidad inducida por drogas A-NMDA, como PCP y MK801, han sido ampliamente reconocidas (15, 16, 75, 76, 194, 276), pero la participación de las hormonas gonadales no ha sido determinada. En este trabajo se demostró que los machos son significativamente menos sensibles que las hembras al efecto neurotóxico de MK801, y que la orquiectomía acrecienta la toxicidad,

mientras que la ovariectomía no tiene un efecto considerable. La supresión de las hormonas gonadales por la gonadectomización tanto de machos como de hembras elimina la respuesta sexualmente dimórfica frente a los efectos neurotóxicos de MK801, dando lugar a un cuadro de neurodegeneración en los animales ORQ y OVX que es indistinguible del de la hembra entera. Estas observaciones fuertemente sugieren que las neuronas de la capa IV de RSG son intrínsecamente sensibles a los efectos neurotóxicos de MK801 y que los andrógenos ejercen sobre ellas una acción protectora.

El estudio temporal en machos enteros y ORQ sobre la neurotoxicidad inducida por MK801 demostró que la expresión de máxima degeneración ocurría a los 3 días de la administración de la droga, revelando en ratas machos un incremento a través del tiempo de somas argirofílicas en RSG, con abundante degeneración terminal en varias estructuras, pero principalmente en las capas I y IV de las cortezas RSG, RSD, V2MM, V2L, y capa I de ENT. Además, se demostró que la orquiectomía sensibilizaba al macho, de modo que, con la misma dosis, la neurotoxicidad incrementaba de manera significativa en el número de somas argirofílicas de RSG con respecto al macho entero. Es interesante destacar que en los animales ORQ, el patrón del curso temporal de la expresión máxima de neurodegeneración era el mismo que el establecido para la rata macho y hembra, o sea 3 días post-administración de la droga.

Al estudiar el efecto protector de los andrógenos frente a la neurotoxicidad inducida por MK801 se observó que la reposición de ambos esteroides androgénicos, TP y DHT, en animales ORQ, redujo significativamente la neurotoxicidad de MK801. Más aún, DHT también disminuyó la toxicidad de MK801 en animales OVX. Es interesante destacar que, al contrario de lo que sucede con DHT, TP no ejerció protección en los animales OVX sugiriendo que su aromatización a estrógeno fue la causa de la pérdida de su efecto protector. Esta observación sugiere que los estrógenos pueden contrarrestar u oponerse a los efectos protectores de los andrógenos. Varias líneas de evidencia sugieren que el EB no sensibiliza a las neuronas de la RSG a la neurotoxicidad de MK801, sino que más bien suprime el efecto neuroprotector de los andrógenos. Primero, el tratamiento con EB no incrementa la neurotoxicidad de MK801 en ratas ORQ, OVX ni en hembras intactas. Segundo, la ovariectomía no redujo la toxicidad de MK801, indicando que los estrógenos gonadales no son necesarios para inducir o incrementar la toxicidad de MK801. Tercero, el efecto neuroprotector de DHT es menos eficiente en hembras enteras (con estrógenos gonadales) que en hembras OVX (sin estrógenos gonadales) y por último, los datos de este trabajo y aquellos presentados por Hur et al. (112) muestran

que el tratamiento con EB incrementa significativamente la toxicidad de MK801 en machos enteros con niveles endógenos de andrógenos gonadales. En conjunto estas observaciones apoyan la interpretación de que DHT ejerce un rol neuroprotector mientras que EB contrarresta este efecto. Por lo tanto el equilibrio entre andrógenos y estrógenos podría delinear la respuesta sexualmente dimórfica de las neuronas de la RSG al efecto neurodegenerativo de MK801.

El mecanismo por el cual las hormonas gonadales disparan la respuesta sexualmente dimórfica frente a la neurodegeneración inducida por MK801 no se ha dilucidado y podrían estar involucrados tanto mecanismos centrales, como periféricos. Previamente se ha reportado que la metabolización de MK801 en plasma y cerebro es menor en la rata hembra que en el macho (12). Llamativamente, la actividad del citocromo P-450 en el hígado es menor en la rata hembra que en el macho, y como resultado el PCP, otro A-NMDA, presenta una respuesta sexualmente dimórfica con una vida media más prolongada en la hembra (180, 181, 228). Por lo tanto, es posible que los estrógenos disminuyan la actividad metabólica del hígado, alterando la farmacocinética del MK801 y de esa manera incrementa la vida media y la disponibilidad para bloquear los receptores NMDA en el cerebro. Mientras que los efectos periféricos de las hormonas gonadales no se pueden descartar, ciertas observaciones apoyan fuertemente acciones directas de las hormonas en el SNC como un mecanismo implicado en la respuesta sexualmente dimórfica de las neuronas al efecto neurodegenerativo de MK801. En el macho entero sistemáticamente aparecen neuronas argirofílicas en la capa V de la RSG después del tratamiento de MK801. Notablemente la orquiectomía disminuye la tinción argirofílica de estas neuronas, por el contrario ambos andrógenos, DHT y TP, restauran el perfil degenerativo de la capa V, indicando que los andrógenos sensibilizan esas neuronas al efecto neurotóxico de la droga. Notablemente, el tratamiento de ratas OVX con DHT es suficiente para inducir la degeneración de neuronas de la capa V, lo que apoya la idea de que los andrógenos no aromatizables sensibilizan las neuronas de la capa V al efecto neurodegenerativo de MK801. Aunque el significado patofisiológico de la muerte de las neuronas de la capa V representa una intriga, su presencia no deja de ser significativa para el análisis de los efectos sexualmente dimórficos del MK801 y el rol de las hormonas gonadales a nivel del SNC.

En el cerebro, el efecto de las hormonas gonadales puede ejercerse a través de una plétora de vías diferentes, incluyendo la modulación de la expresión de genes, la activación de cascadas de señalización, el sostén de la homeostasis del calcio, la

modulación de neurotrofinas, entre otras. Por ejemplo las hormonas gonadales podrían modificar la toxicidad de MK801 a través de la expresión y/o disponibilidad de los receptores de neurotransmisores. Se ha descrito que la orquiectomía disminuye la unión de MK801 en subcampos del septum y del hipotálamo (139), pero a su vez aumenta la unión de MK801 en la región hipocampal de CA1 (139, 140), un área que expresa niveles relativamente elevados de receptores de andrógenos (98, 230). Es importante resaltar que estas alteraciones pueden revertirse con el tratamiento de DHT (139, 140), indicando que la unión de MK801 en ciertas áreas del cerebro puede modularse a través de los niveles circulantes de andrógenos. Además los andrógenos pueden alterar la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 (209, 234) y las protege contra la excitotoxicidad inducida por NMDA (209). Por lo tanto, es posible que los andrógenos circulantes pudieran modular la función del receptor NMDA y por ello prevenir la degeneración neuronal inducida por MK801.

Por otro lado, se demostró que el efecto protector de los andrógenos es contrarrestado por el EB. Esta acción de los estrógenos es inesperada, ya que se conoce su efecto protector frente a diferentes injurias en neuronas hipocampales y corticales, a través del receptor alfa (63, 229). En otro estudio, se habría demostrado que con dosis similares de EB se promueve una reducción en el número de neuronas vacuoladas inducidas por 0,5 mg/kg de MK801 (62), sugiriendo un rol potencialmente protector de EB en la neurotoxicidad reversible de MK801. Sin embargo, en éste trabajo se demostró ciertamente que EB no ejercía una acción protectora frente a la neurotoxicidad irreversible de 5 mg/Kg MK801, sino más bien se contraponía al efecto protector de testosterona. No se puede descifrar si los estrógenos y los andrógenos actúan sobre el mismo blanco molecular, o si actúan sobre diferentes vías de señalización. Varias líneas de investigación han presentado evidencia indicando que EB aumenta respuestas hipocampales mediadas por el receptor NMDA, incrementando la unión del receptor NMDA, y la expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en CA1 (45, 46, 83, 263, 271, 272, 274). EB incrementa la excitabilidad y el disparo repetitivo de las neuronas (271) disminuyendo el umbral para convulsiones (35, 107, 273). Además, EB también podría influir sobre la toxicidad inducida por MK801 a través de la disminución de la función GABAérgica (177, 217), y de esa manera disminuir el control tónico de la inhibición. Interesantemente, los agonistas GABAérgicos como las benzodiazepinas y los barbitúricos previenen la neurotoxicidad en la RSG inducida por tratamientos con MK801 o PCP (193, 196). Por lo tanto, estrógenos y andrógenos podrían modular la

respuesta dimórfica frente a MK801 actuando sobre el mismo blanco, como por ejemplo la transmisión glutamatérgica, o por la modulación de circuitos polisinápticos complejos que involucran a diversos neurotransmisores.

Analizando otras estructuras corticales este trabajo reveló que, de la misma manera que en ratas hembras, los ORQ presentan un cuadro de neurotoxicidad inducida por MK801 que incluye somas argirofílicas en ENT y en el PLCo y degeneración terminal en RSD, V1MM, V2MM y V2L, ENT, PRh, Ect y capa CA1 del hipocampo dorsal (33, 34). Este cuadro fue aún más consistente con dosis de 10 mg/kg, que con 5 mg/kg, confirmando la dosis dependencia de la neurodegeneración inducida por MK801. El curso temporal de la expresión de la neurotoxicidad en el ORQ fue también semejante al de la rata hembra, con una expresión máxima alrededor de los 3 días de sobrevida. La semejanza entre hembras y ORQ en el cuadro degenerativo de las áreas corticales paralímbicas y de asociación podrían indicar que éstos tendrían un mecanismo de neurotoxicidad similar y refuerzan el rol de las hormonas sexuales en la delineación de este proceso en diversas áreas cerebrales. Sin embargo, esta posibilidad es cuestionada por la observación que aún con las dosis más altas (10-15mg/kg), no pudo observarse el mismo patrón de degeneración en el DG ó en la PIR entre el ORQ y la rata hembra.

Tanto en humanos como en animales de experimentación, existen diferencias sexuales en el consumo, la sensibilización, la adicción y la recaída frente a drogas de abuso, en donde las hembras son más sensibles que los machos (22). El análisis de la expresión del GET c-Fos igualmente revela un dimorfismo sexual frente a los efectos de anfetamina, en donde machos y hembras gonadectomizados tienen una respuesta dimórfica en el estriado y áreas de proyección, indicando que la repuestas no sólo depende de los niveles hormonales presentes sino que también existen otros factores, como la cantidad de receptores dopaminérgicos D1 y D2, o la velocidad de la recaptación de dopamina e incluso, los circuitos que responden al incremento de dopamina podrían ser dimórficos y/o modulados por los estrógenos (22). Estudios sobre diferencias sexuales frente al efecto de la nocicepción y morfina, demostraron que no sólo existen acciones de las hormonas gonadales sobre los circuitos del dolor (49), sino que además, acciones específicas de los genes localizados en los cromosomas X e Y contribuían a las diferencias observadas, identificando la contribución de los cromosomas sexuales X e Y por sobre los efectos moduladores de las hormonas gonadales (87, 88).

En la hembra, MK801 induce una intensa degeneración somática en la capa granular y degeneración terminal en las capas moleculares y polimórficas del DG. En la PIR de la hembra, en la capa IIa aparecen somas apoptóticas con una densa degeneración

terminal que se extiende a la capa Ib (33, 34, 111, 190, 196, 276, 183) mientras que en el macho ORQ la degeneración es incipiente y en la mayoría de los casos analizados, nula. Estas observaciones indicarían que el mecanismo de neurotoxicidad de la PIR y del DG, ambas estructuras límbicas, no dependen de los mismos factores que las áreas corticales paralímbicas y de asociación que están afectadas en las ratas hembras y machos (enteros y ORQ), revelando que la hembra presenta una vulnerabilidad intrínseca frente a los A-NMDA en éstas estructuras del SNC. Estos resultados indicarían que las diferencias sexuales frente a la neurotoxicidad inducida por MK801 estarían mediadas por mecanismos dependientes e independientes de los esteroides sexuales.

En humanos, las drogas A-NMDA inducen síntomas psicóticos que son indistinguibles de los episodios agudos de esquizofrenia (61, 137, 138, 188, 174) y por ello han sido propuestas como modelos farmacológicos de esquizofrenia. Paralelamente al cuadro revelado por los estudios de neurotoxicidad, la capacidad de estas drogas de inducir las conductas psicóticas es dependiente de la edad de la persona (16, 72, 190). Individuos de cualquier edad pueden ser expuestos a estos agentes cuando se utilizan como anestésicos y analgésicos, pero las conductas psicóticomiméticas rara vez se observan en niños, mientras que la frecuencia incrementa hacia la adolescencia (10-16 años) y es más frecuente y severa en jóvenes y adultos (212, 267). Correlacionando estos datos con el inicio de los síntomas de la esquizofrenia, que ocurre en la adolescencia, se sugiere que podría existir una relación entre esta patología y la presencia de las hormonas gonadales. Recientemente, se ha revelado que los niveles circulantes de andrógenos se correlacionan inversamente con la gravedad de los síntomas negativos en pacientes masculinos con esquizofrenia (4, 131). En base a esas observaciones y a los datos emergentes de este estudio, es tentador especular que la influencia de las hormonas gonadales frente a la neurotoxicidad del A-NMDA, MK801 serviría para revelar los mecanismos moleculares en donde las hormonas podrían modular la conducta disfuncional inducida por la hipofunción del receptor NMDA que existe en algunas patologías psicóticas.

En conjunto, este estudio refuerza el rol de sensibilización que existe en ausencia de los andrógenos y un efecto dimórfico anatómico frente a la neurotoxicidad inducida por MK801. Estos datos son importantes para identificar las causas de las diferencias sexuales en el mecanismo por el cual los antagonistas de los receptores NMDA inducen neurotoxicidad y a su vez para contribuir en el estudio de los efectos terapéuticos de drogas antipsicóticas.

2) ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS MORFOFUNCIONALES INDUCIDOS POR EL EFECTO NEUROTÓXICO DE MK801

Consideraciones previas al mapeo de la expresión de los GET

Los GET han sido utilizados como marcadores anatómicos funcionales de neuronas frente a diferentes paradigmas experimentales como por ejemplo el estudio del efecto que ejercen diferentes drogas sobre el SNC, incluidas aquellas que tienen efectos neurotóxicos o neurodegenerativos (224, 233, 278, 281). Similar a muchos otros estímulos, las hormonas esteroideas también afectan la expresión de los GETs. Este aspecto es particularmente importante a la hora de analizar la expresión de GETs inducidos por MK801 ya que nuestros datos precedentes demostraron que el efecto neurotóxico de MK801 es sexualmente dimórfico y estaría particularmente modulado por andrógenos y estrógenos. Más aún, la orquiectomía sensibiliza a la toxicidad de MK801 produciendo un cuadro de degeneración casi indistinguible al de la rata hembra.

En la rata hembra, los estrógenos y progesterona tienen efectos de potenciación e inhibición complejos sobre la expresión de c-Fos en áreas sensibles a los efectos de los estrógenos dentro del ciclo estrual (104, 205), no pudiendo descartarse similares regulaciones sobre otros GETs. Para abordar el estudio de los cambios inducidos por MK801 en la expresión de GETs de manera libre del efecto cíclico de hormonas esteroideas en hembras, en este estudio empleamos ratas macho intactos y ORQ, que presentan un cuadro degenerativo similar al de la hembra. Este aspecto es particularmente relevante a la hora de analizar la AEX, ya que varios núcleos amigdalinos, como el BSTL, son sexualmente dimórficos.

La utilidad de los GETs radica en su expresión rápida y transitoria de forma tal que luego de aplicada la sustancia experimental el cambio en la expresión del ARNm puede detectarse alrededor de los 30 y 120 minutos (94, 95), y el de su proteína entre los 60 y 180 minutos aproximadamente (136), posibilitando vincular temporalmente las poblaciones neuronales que responden funcionalmente a la droga experimental. En nuestro estudio observamos sin embargo, cambios dramáticos sostenidos hasta 72 horas posteriores a la aplicación de una única dosis de MK801 en la expresión de 3 GETs diferentes: c-Fos, FosB y EGR1. Si bien algunos procesos degenerativos pueden inducir artefactos de tinción (positiva o negativa) por inmunohistoquímica, una serie de evidencias indican que, en nuestro modelo de estudio, esa posibilidad puede ser

descartada. Primero, artefactos de tinción relacionados con procesos degenerativos no han sido descritos para los diferentes anticuerpos primarios utilizados en este estudio. Así, el anticuerpo de c-Fos (sc-52) es un reconocido anticuerpo policlonal específico contra el péptido c-Fos p62, que no presenta reacción cruzada con FosB/ Δ FosB, Fra-1 y Fra-2 (124). Similarmente, para detectar la expresión de FosB se empleó el anticuerpo sc-48 que reconoce específicamente FosB y su isoforma truncada Δ FosB (204). Segundo, a diferencia de otros anticuerpos empleados en este trabajo contra proteínas ligadoras de Ca^{+2} (calretinina y parvalbúmina), en todos los casos la marcación inmunohistoquímica para los GETs se observó restringida al soma neuronal y sin marcación citoplasmática, tal como ha sido reportado por numerosos autores. Tercero, la marcación contra GETs no se restringió a neuronas en proceso de muerte celular tal como lo evidenció la tinción A-Cu-Ag o FJB, demostrando que el proceso degenerativo no indujo artefactos en la tinción inmunocitoquímica. Cuarto, la expresión de los tres GETs analizados mostró un patrón anatómico y temporal diferente, indicando la especificidad de la inmunomarcación para cada uno de ellos. Finalmente, una serie creciente de evidencias indica que la expresión de GETs puede mantenerse sostenida en el tiempo en respuesta a diferentes condiciones degenerativas o adaptativas a largo plazo (199-201).

Así, observamos que la expresión de c-Fos precede y acompaña la muerte neuronal en la capa IV de RSG evidenciada por A-Cu-Ag, sugiriendo que la expresión sostenida de c-Fos en esta región cortical es un indicador de un proceso de muerte neuronal. Apoyando esta interpretación, se han correlacionado las expresiones transitoria y prolongada del ARNm de c-Fos con concentraciones de amino ácidos excitatorios no tóxicos y tóxicos, respectivamente (94, 95, 216) postulándose que la expresión sostenida del ARNm de c-Fos sería un biomarcador específico de excitotoxicidad. Por otra parte, en las mismas poblaciones neuronales de RSG y paralelamente a la expresión sostenida de c-Fos y al incremento en muerte neuronal evidenciada por A-Cu-Ag y FJB, encontramos una marcada reducción de la expresión de otro GET, el EGR-1. Previamente otros autores observaron que MK801 y PCP inducen una activación inicial, seguida por una supresión del ARNm EGR-1 (80, 81) similar a la descrita en este trabajo. También se reportaron cambios en la expresión de EGR-1 en procesos de muerte neuronal excitotóxica causada por isquemia y convulsiones inducidas por ácido kaínico (82, 109, 227). Es interesante destacar que la expresión de este GET estaría mediada por los niveles celulares del ion zinc (Zn^{+2}). Por lo tanto es posible especular que un proceso excitotóxico mediado por un exceso de Zn^{+2} estaría mediando el efecto neurotóxico de

MK801 en las neuronas de la capa IV de RSG, las cuales son altamente ricas en Zn^{+2} (Figura 27 A y B). Esta posibilidad en principio paradójica, debido a que el MK801 es un antagonista de los receptores NMDA, podría indicar que otros receptores glutamatérgicos estarían implicados en ese proceso neurotóxico. Así, la activación de receptores AMPA/KA glutamatérgicos también produce el ingreso de iones de Zn^{+2} y Ca^{+2} y puede causar excitotoxicidad y la muerte celular (265). Esta posibilidad apoya la hipótesis (193) que propone que el bloqueo de receptores NMDA en neuronas GABAérgicas libera transmisiones excitatorias que afectan particularmente a las neuronas de la capa IV de RSG. El alto contenido en Zn^{+2} de estas neuronas podría explicar la particular vulnerabilidad de las mismas al efecto neurotóxico del MK801 (Figura 27 B y C)

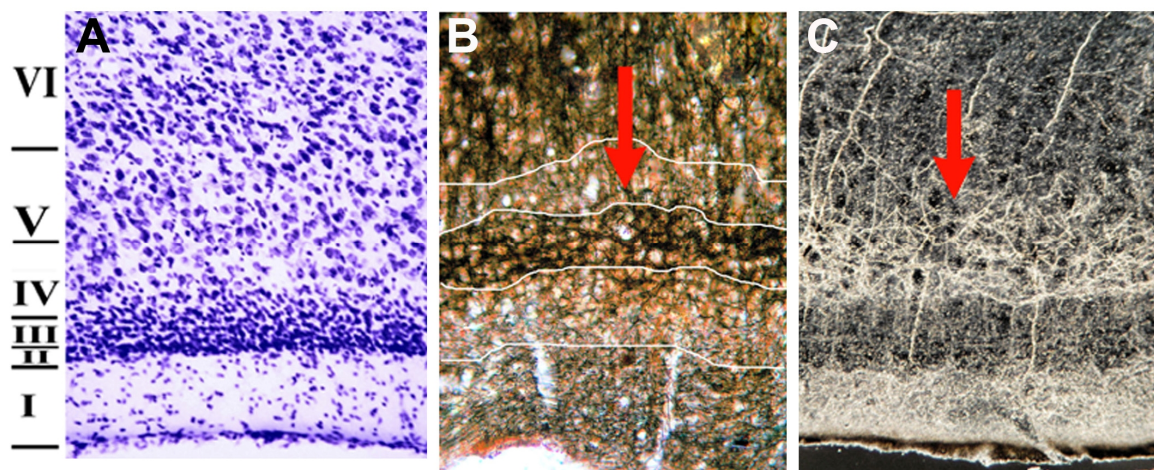


Figura 27: Ilustración de la capa IV de la RSG con las técnicas de Nissl, TIMM y A-Cu-Ag revela que los depósitos de zinc coinciden con la localización de la degeneración inducida por MK801. **(A)** Fotomicrografía de un corte sagital de la RSG de una rata control teñido con la técnica de Nissl para determinar las diferentes capas corticales. **(B)** Fotomicrografía de un corte sagital de la RSG de una rata control teñido con la técnica de TIMM en el cual los depósitos de Zn^{+2} se tiñen de color negro. **(C)** Fotomicrografía en campo oscuro de un corte sagital de la RSG de una rata ORQ y tratada con 10 mg/kg de MK801 teñido con la técnica de A-Cu-Ag para revelar neurodegeneración de somas y terminales positivas para plata. En la RSG, la cual es altamente rica en Zn^{+2} , se puede apreciar como los depósitos más intensos de Zn^{+2} coincide con la localización selectiva del proceso excitotóxico mediado por el efecto neurotóxico de MK801 en las neuronas de la capa IV de RSG.

Por otra parte, en otras áreas corticales como V2L y V2MM la marca sostenida de c-Fos no correlacionó ni con el descenso en la expresión de EGR-1 ni con la muerte neuronal observado en RSG. Por el contrario, en estas estructuras corticales la expresión de c-Fos estuvo asociada a la posterior aparición de terminales degenerativos que coincidieron temporalmente con un incremento sostenido de FosB/ Δ FosB. Esto indica que la sobre-expresión de c-Fos no siempre es indicador de muerte somática neuronal sino que además pondría estar poniendo de manifiesto otros procesos plásticos como la desaferentación de conexiones. Es interesante destacar que se ha propuesto que la proteína FosB y su isoforma trunca Δ FosB jugarían un rol importante en el control de los cambios adaptativos de plasticidad neuronal asociado a diversas condiciones (47, 159). Δ FosB tiene una vida media más prolongada que los otros miembros de la familia del Fos, pudiendo persistir varios días o semanas (37, 159). Esto sería debido a que esta proteína presenta la característica de ser inusualmente estable por la ausencia de dominios que favorecen la degradación proteosomal de otras proteínas de la familia del Fos (37, 47, 202-204). La expresión sostenida de Δ FosB se ha relacionado con cambios neuronales adaptativos asociados a diversas condiciones tales como el estrés (203), adicción a drogas (186, 187) administración de antipsicóticos y de antidepresivos (14, 215). Nuestros datos demuestran por primera vez que una única dosis neurotóxica de MK801 induce la expresión sostenida de FosB/ Δ FosB a lo largo de varios días en diversas áreas corticales donde se evidencia degeneración de terminales. Diversos autores describen alteraciones conductuales en la actividad locomotora, en el aprendizaje, en la potenciación a largo plazo (LTP), en la memoria de trabajo y en la formación de la memoria espacial varias horas o días posteriores al tratamiento de una única dosis de MK801 u otros A-NMDA (157, 280). Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto que el efecto anatomo-funcional del MK801 se expande más allá de su vida media, y sugiere que cambios plásticos persistentes podrían mediar las alteraciones conductuales que subyacen al efecto de los antagonistas NMDA.

Estudio de la inducción de proteínas codificadas por los genes de expresión temprana por una dosis neurotóxica de MK801

Los resultados anatómofuncionales obtenidos en este estudio demostraron que una dosis neurotóxica aguda del MK801 indujo cambios específicos y persistentes en la expresión de las proteínas codificadas por los 3 diferentes GETs, c-Fos, FosB/ Δ FosB y EGR-1 en diversas estructuras cerebrales. A través del estudio temporal de la expresión de c-Fos, se corroboró la rápida y sostenida inducción en cortezas RSG, RSD y ENT y además, se reveló un incremento llamativamente prolongado en regiones previamente no reportadas como blancos de MK801, tales como CeL, BSTL, V2MM y V2L. A su vez, MK801 indujo un significativo incremento de FosB/ Δ FosB restringido a áreas corticales afectadas por degeneración de terminales (RSG, RSD, V2L, V2MM, ENT), sugiriendo que la inducción de FosB/ Δ FosB podría estar ligada a cambios adaptativos desencadenados por la pérdida de conectividades sinápticas. Por el contrario, MK801 indujo una dramática reducción de EGR-1 exclusivamente en la capa IV de RSG, coincidiendo con la presencia de somas degenerativos revelados por A-Cu-Ag y FJB, sugiriendo que la supresión de EGR-1 podría estar ligada a la muerte neuronal.

La respuesta de los 3 GETs analizados fue distintiva en su distribución regional, tiempo y magnitud de expresión, observándose respuestas de corto (3hs) y largo plazo (24-72hs). Considerando que una serie de estudios demuestran que la vida media de MK801 en el cerebro no superaría las cuatro horas, es de esperar que la respuesta de los GETs luego de 24 horas sea debida a efectos secundarios de MK801, no causados por la directa inhibición de los receptores NMDA. Trabajos previos mostraron que dosis bajas (subtóxicas) de A-NMDA inducen cambios rápidos y transitorios en la expresión de GETs (80, 81, 247). Nosotros observamos que una dosis más alta (tóxica) de MK801 generó similares modificaciones en la expresión de GETs pero de una magnitud y persistencia en el tiempo mucho mayores, principalmente en ciertas estructuras tales como RSG, RSD, V2MM, V2L, ENT, CeL y BSTL que mostraron una sostenida expresión aún tres días posteriores al tratamiento. Sorprendentemente, de todas las estructuras analizadas, la única que reveló cambios significativos de muerte neuronal (muerte somática) y alteraciones de corto y largo plazo en la expresión de los 3 GETs analizados fue las RSG. Así la neurodegeneración inducida por MK801 en la capa IV de RSG observada en el macho, y más aún en el ORQ, coincidió con una inducción altamente significativa en la expresión de c-Fos entre 3 y 24 horas, de FosB/ Δ FosB entre

las 12 y 72 horas y que persistió aún luego de 7 días, sugiriendo que la misma correspondería principalmente a Δ FosB (203). Curiosamente, a pesar de la importante diferencia en la sensibilidad a MK801 entre machos enteros y ORQ, la expresión de FosB/ Δ FosB en RSG no fue la estructura con mayor diferencia significativa. Es probable que la gran cantidad de muerte somática observada en el ORQ y no en el macho entero sea la causa de la paralela caída en el número de células FosB/ Δ FosB positivas. Esta posibilidad es apoyada por la significativa disminución en la expresión de EGR-1, principalmente en los ORQ, correlacionándose inversamente con la cantidad de muerte somática. En conjunto estos datos muestran que las neuronas de la capa IV de la RSG son el blanco principal y selectivo de los efectos neurotóxicos de MK801. Esta observación es consistente con numerosos trabajos previos (74, 76, 194, 195, 227, 246) y sugiere que la degeneración de esas neuronas y sus fibras irradiaría hacia las estructuras homológicamente relacionadas, causando en ellas remodelaciones adaptativas y plásticas de más larga duración.

La compleja naturaleza de los circuitos corticales dificulta la interpretación del origen de inducción de FosB/ Δ FosB en las áreas corticales sensoriales V2L y V2MM, que no serían el blanco primario del efecto neurotóxico de MK801. El ingreso de la información a las áreas corticales sensoriales proviene del tálamo a la capa IV (granular) de la corteza visual, la cual es transmitida a las capas II-III para su integración, y es luego proyectada a recíprocamente con áreas corticales homotípicas contralaterales e ipsilaterales. Desde estas capas supragranulares (II y III), las conexiones pasan a las capas infragranulares (V-VI) y luego retornan a la capa IV. En todos los casos se piensa que las conexiones excitatorias estarían mediadas por glutamato (124). Por tanto, la inhibición de receptores NMDA por MK801 en diversos puntos del circuito podría explicar el cambio funcional de las neuronas de V2L y V2MM asociados a la inducción de la expresión de FosB/ Δ FosB. De hecho tanto la corteza retrosplenial como V2MM reciben aferencias del núcleo anteromedial de tálamo (214), lo que permite el procesamiento coordinado del estímulo visual-espacial. Es posible también pensar que el bloqueo del receptor NMDA de neuronas GABAérgicas en el tálamo cause desinhibición de neuronas excitatorias que proyectan a estos sitios, induciendo una respuesta de FosB/ Δ FosB incrementada. Alternativamente, la muerte de las neuronas de la capa IV de RSG podría ser el origen de los cambios funcionales observados mediante la expresión de FosB/ Δ FosB en V2L y V2MM. Esta posibilidad es consistente con los cambios temporales observados en el patrón de neurodegeneración y expresión de marcadores

funcionales (GETs). Así, la degeneración somática en RSG coincide temporalmente con la aparición de degeneración terminal en sus diversos sitios de proyecciones intra-retroespleniales (ipsi- y contralateral), parahipocampales (subiculum, postsubiculum y ENT) y sensorialvisual (V2L y V2MM) (260) los cuales evidencian una simultánea inducción de FosB/ Δ FosB. Consistente con la idea de que los terminales degenerativos provienen de neuronas ubicadas en capa IV de la RSG, los ORQ, que demuestran mayor cantidad de somas muertas en la capa IV de RSG, también muestran una degeneración de terminales más intensa en las estructuras corticales mencionadas. El impacto anatómico funcional de la irradiación degenerativa desde RSG se puede apreciar con la expresión de las proteínas del GET FosB/ Δ FosB. Así, al analizar el efecto de MK801 en corteza sensorial empleando simultáneamente la técnica A-Cu-Ag para revelar la degeneración terminal e inmunocitoquímica para analizar la expresión de FosB/ Δ FosB, encontramos una precisa colocalización de terminales degenerativos en las capas IV corticales sensoriales conjuntamente con neuronas FosB/ Δ FosB positivas. Por lo tanto, es posible sugerir que la inducción de FosB en las estructuras corticales sensoriales es un reflejo funcional de su desaferentación de RSG.

En la rata, la RSG es un punto nodal importante para la integración y la distribución subsiguiente de la información recíproca entre las cortezas límbicas y visuales, de la formación hipocampal, y del tálamo (254). Así, lesiones de la corteza retroesplenia en ratas producen déficit en la navegación espacial (3, 99) y en la memoria espacial (251, 254). Los estudios desarrollados en primates confirman el papel de la corteza retroesplenia en el aprendizaje y la memoria (178, 248) y han demostrado a través del trazado de vías con marcación retrógrada, conexiones directas desde la amígdala y la corteza retroesplenia, proveyendo un mecanismo directo para la integración de la información emocional y la memoria espacial (32). Esa posibilidad es apoyada por estudios de imágenes realizados en seres humanos que sugieren que la corteza retroesplenia sería la interfase entre la emoción y la memoria episódica (153, 154, 261). Así, para varias especies, la corteza retroesplenia jugaría un rol importante en el procesamiento de la información emocional, la memoria espacial y el aprendizaje, las cuales suelen estar alteradas en animales tratados con A-NMDA y que además, replican las disfunciones cognitivas reportadas en humanos bajo los efectos de estas drogas (138) y que curiosamente son similares a la de los pacientes con esquizofrenia (11, 262). El grado de disfunción inducido por MK801 o drogas similares en las neuronas de la capa

IV de RSG y su irradiación a estructuras corticales sensoriales blanco sería, por lo tanto, el origen de las posteriores disfunciones conductuales observadas.

La AEX está densamente interconectada con estructuras que son afectadas por el tratamiento neurotóxico con MK801. Esto incluye a la propia corteza retrosplenial (32), que sería el blanco primario del efecto neurotóxico de MK801, además de áreas secundarias, afectadas por la degeneración de terminales como lo son postsubiculum, parasubiculum, presubiculum, corteza perirhinal y ENT. En contra de las expectativas, este estudio no arrojó evidencias de neurodegeneración en AEX causados por efecto de MK801, indicando que la AEX no es un blanco primario del efecto neurotóxico de MK801. Sin embargo, encontramos claras evidencias de una alteración funcional en AEX causada por el efecto de la droga. Así, observamos una muy significativa y sostenida inducción de c-Fos en AEX en animales tratados con MK801. Interesantemente, esta inducción fue selectivamente restringida a los núcleos CeL y BSTL de la porción central de AEX, sin evidencia de la participación del núcleo medial de AEX. Los datos obtenidos no nos permiten determinar en forma precisa la relación entre la expresión prolongada de c-Fos y las alteraciones observadas en estructuras corticales. La falta de terminales degenerativos en AEX fuertemente sugiere que la inducción de este GET en CeL y BSTL no sería causado en forma directa por la degeneración de las neuronas de la capa IV de RSG, abriendo la posibilidad de que la inducción de este GET en AEX sea causada por efectos derivados de la degeneración de terminales de RSG en estructuras corticales sensoriales que luego proyectan a AEX, como V2L y ENT. Independientemente de ello, estas son las primeras evidencias que involucran a estructuras amigdalinas en el efecto de MK801 y sugieren que una disfunción en AEX central también contribuiría a las alteraciones comportamentales ligadas a los efectos de los A-NMDA. Esta posibilidad es consistente con el rol propuesto para la AEX en el control de diferentes conductas emocionales y motivaciones, incluyendo aquellas afectadas en diferentes desórdenes neuropsiquiátricos, tales como la adicción, la depresión y la esquizofrenia (66, 102, 146, 206, 239). Así, se ha visto que drogas antipsicóticas revierten algunas de las conductas específicas inducidas por los A-NMDA, tales como la inhibición de prepulso, la cual sería una medida del filtro sensorial que se regularía por la amígdala (73). Llamativamente, la administración de antipsicóticos como el haloperidol y clozapina generan una inducción de c-Fos en neuronas GABAérgicas de CeL y BSTL de la AEX (150, 151, 206), sugiriendo que estos núcleos son blanco importante de los antipsicóticos. Nuestros datos, en conjunto con

estas observaciones sugieren que poblaciones neuronales específicas de la AEX son blancos de los efectos secundarios o terciarios de la hipofunción NMDA inducida por diferentes antagonistas como el MK801, involucrándola en la disfunción conductual inducida por estas drogas.

3) ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS INDUCIDOS POR EL EFECTO NEUROTÓXICO DE MK801

Análisis de subpoblaciones de neuronas que contienen proteínas fijadoras de calcio tras la administración aguda de MK801

La hipótesis de la hipofunción del receptor NMDA se basa en que la disfunción de los receptores NMDA, particularmente en las interneuronas GABAérgicas, lleva a una pérdida de la inhibición que produciría un efecto secundario de sobre-estimulación en el sistema glutamatérgico y monoaminérgico (68, 69, 71, 168, 193, 196). Se ha demostrado como consecuencia de la hipofunción NMDA, un exceso de la liberación de glutamato, como también de acetilcolina, en regiones corticales (129). El complejo sistema de señales desinhibitorias que lleva a una hiperestimulación en circuitos corticales, sugeriría un cambio funcional en las interneuronas corticales. Este hecho también se basa en resultados previos realizados en animales de experimentación (41), los cuales demostraron que el tratamiento agudo o crónico de PCP, ketamina o MK801, inducía una disminución significativa de la expresión de PV en diferentes áreas del cerebro. Estudios neuropatológicos de cerebros humanos han presentado evidencia que además del sistema dopaminérgico-glutamatergico, una disfunción en las interneuronas GABAérgicas del hipocampo y de la corteza estarían involucradas en la patofisiología de la esquizofrenia (68, 71).

La gran mayoría de las interneuronas GABAérgicas corticales y del hipocampo pueden definirse esencialmente como sub-poblaciones que pueden contener neuropeptidos o proteínas ligadas al Ca^{+2} (CaBP), las cuales difieren en los blancos que inervan y de las aferencias que reciben.. Gonchar y Burkhalter (91) caracterizaron neuronas GABAérgicas que contenían las CaBP: parvalbumina (PV), calretinina (CR), somatostatina y calbindina en la corteza visual de ratones y demostraron que se podía distinguir tres tipos de familias de neuronas GABAérgicas. El primer grupo consistía en neuronas PV positivas, las cuales demostraron ser el 100% GABA positivas. En el segundo grupo, el 93% colocalizaba con GABA y eran neuronas CR positivas. Finalmente el tercer grupo de neuronas, las cuales expresaban somatostatina, colocalizaban con GABA pero en menor medida que los grupos anteriores, pero además una gran proporción presentaba doble tinción con calbindina (86%), demostrando a la vez que la expresión de calbindina no distingue un grupo específico de neuronas

GABAérgicas. Por lo tanto, la caracterización inmunohistoquímica de CaBP ofrece la posibilidad de discriminar entre subgrupos de interneuronas GABAérgicas.

Con la intención de identificar poblaciones neuronales blancas del efecto neurotóxico de MK801, en este trabajo analizamos subpoblaciones neuronales ricas en calretinina (CR) y parvalbumina (PV), dos proteínas ligadoras de Ca^{+2} (CaBP) que se expresan selectivamente en neuronas GABAérgicas.

En las diferentes regiones corticales analizadas, las neuronas CR positivas mostraron en su gran mayoría, una morfología bipolar orientada radialmente hacia la superficie cerebral. Además, se observó una proporción menor de células multipolares con dendritas ramificadas en penachos. Estas observaciones son coincidentes con las descripciones de otros autores (128, 249). Dentro de las estructuras amigdalinas estudiadas, se observó reactividad de CR dentro de las diferentes subdivisiones, concordando con reportes previos sobre la expresión basal de CR (128). Ni la distribución general, ni el aspecto morfológico, ni el número de neuronas CR positivas en las diferentes regiones cerebrales analizadas se vieron afectados luego del tratamiento con MK801. Estas observaciones fuertemente sugieren que las neuronas GABAérgicas CR positivas no serían las principales poblaciones neuronales afectadas por degeneración y/o muerte neuronal tras la aplicación de una dosis tóxica de MK801.

Por otra parte, la expresión de PV sólo se analizó de manera exhaustiva en estructuras corticales, debido a su nula presencia en los núcleos amigdalinos central y medial tanto de los animales controles (salina) como los tratados con MK801. Esa escasez de neuronas PV en AEX concuerda con la previamente reportada en el trabajo de Kemppainen y Pitkanen (128). En las diferentes capas corticales la cantidad de neuronas PV positivas fue variable. Así, en los animales controles (salina), encontramos una ausencia total de neuronas PV en la capa I, un incremento gradual del número hacia las capas IV-V, seguido de una reducción notable en la capa VI. Este gradiente observado en la expresión de PV en corteza fue claramente compatible con reportes previos (249, 91, 92). Morfológicamente, encontramos dos tipos neuronales PV positivos, que fueron descritos anteriormente por Gonchar y col (91, 92) como neuronas en candelabro y en cesto. Observamos que el tratamiento con MK801 no indujo cambios apreciables ni en el número, ni la distribución ni en el aspecto morfológico de las neuronas GABAérgicas PV positivas de las diferentes cortezas analizadas (RSG, RSD, V2MM, V2L, ENT). Además, tampoco encontramos evidencias que las neuronas PV mostrasen una particular diferencia en la expresión del GET FosB/ Δ FosB luego del tratamiento con MK801,

argumentando en contra de la posibilidad de que estas poblaciones neuronales sean un blanco funcionalmente significativo del tratamiento con MK801. Asimismo, al analizar estructuras que revelan muerte somática, como en RSG, no hubo colocalización entre neuronas PV positivas y FJB. Estos datos indicarían que la pérdida neuronal revelada por la A-Cu-AG y FJB no sería de la población de neuronas GABAérgicas PV positivas. Es posible especular que las poblaciones GABAérgicas CR y PV sean resistentes al efecto neurotóxico de MK801 debido a una potencial acción protectora de las CaBP, que por su importante rol en la captación del Ca^{+2} libre, mantendrían un riguroso balance en la homeostasis de ese ión, evitando así su potencial participación en el proceso de excitotoxicidad (103). Independientemente de esta posibilidad, nuestros datos fuertemente sugieren que al menos las neuronas GABAérgicas PV y CR no serían blancos del proceso degenerativo inducido por MK801. Hasta el presente el fenotipo neuronal blanco de los efectos neurodegenerativos de MK801 no es conocido, y si bien un cúmulo de evidencias apunta hacia subpoblaciones GABAérgicas, nuestras observaciones arrojan un manto de incertidumbre sobre esa posibilidad.

CONCLUSIÓN FINAL

El presente estudio caracterizó el dimorfismo sexual de la neurotoxicidad inducida por MK801 sobre las neuronas de la capa IV de la RSG. Se demostró que la orquiectomía de machos induce un marcado aumento de la sensibilidad a MK801 y que los andrógenos (principalmente la forma no aromatizable de testosterona, la dehidrotestosterona) protegen a las neuronas de la capa IV de RSG del efecto neurotóxico de MK801. A su vez, se observó que los estrógenos contrarrestan el efecto protector de los andrógenos.

Este estudio también reveló además, que luego de administrar una dosis neurotóxica de MK801 ocurren cambios en la expresión de los GETs: c-Fos, FosB y EGR-1. Esos cambios son llamativamente sostenidos en el tiempo, persistiendo por un periodo que supera por mucho la vida media de la droga en el cerebro. Encontramos que muchos de estos cambios en la expresión de los GETs se correlacionan precisamente con procesos de degeneración, tanto somática (muerte neuronal) como de terminales (desaferentación sináptica). La degeneración somática fue mayoritariamente observada en las neuronas de la capa IV de RSG, indicando que esas neuronas son particularmente vulnerables al efecto tóxico de MK801. La muerte de las neuronas de capa IV RSG se correlacionó con la aparición de terminales degenerativos en diferentes áreas donde esas neuronas proyectan, sugiriendo que la muerte de las mismas causó la desaferentación sináptica de las neuronas blanco. Esa desaferentación fue acompañada por la inducción sostenida de FosB, indicativo de cambios funcionales persistentes en diferentes circuitos corticales, incluyendo V2L, V2MM, ENT. Más aún, es posible que el proceso de remodelado de los circuitos de estas áreas corticales, las cuales proyectan a diferentes núcleos de la amígdala, indirectamente sean el sustrato que induce el cambio de la expresión de c-Fos en CeL y BSTL.

En conjunto, nuestros datos nos permiten sugerir que los cambios inducidos por MK801 afectan principalmente el circuito neuronal cortical que irradia desde las neuronas de la capa IV de RSG a las estructuras blanco de estas neuronas. Las neuronas de capa IV de RSG serían el blanco primario del efecto de MK801, que cuando es aplicado en dosis neurotóxica, induce la muerte de las mismas. Desde las neuronas de capa IV de RSG la disfunción inducida por MK801 se expandiría hacia blancos secundarios del circuito que reciben proyecciones desde las mismas, incluyendo neuronas en la capa IV de V2L, V2MM, y ENT. Efectos de remodelado permanente en estas

estructuras secundarias, inducidas por la pérdida de los terminales procedentes de RSG, podrían llevar a las alteraciones funcionales en estas neuronas que se expandirían hacia blancos terciarios donde estas neuronas proyectan. Entre esos blancos terciarios hemos identificado a los núcleos CeL y BSTL de la AEX central. La remodelación de estos circuitos inducida por la pérdida permanente de las aferencias de RSG podría ser la base de los cambios persistentes en los GETs observadas luego de la aplicación de una única dosis de MK801.

CAPÍTULO 5
REFERENCIAS

1. Adler CM, Goldberg TE, Malhotra AK "Effects of ketamine on thought disorder, working memory and semantic memory in healthy volunteers". *Biological Psychiatry* 43:811-816, (1998).
2. Adler CM, Malhotra AK, Elman I, Goldberg T, Egan M, Pickar D, Breier A "Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia". *Am J Psychiatry* 156:1646-1649, (1999).
3. Aggleton JP, Vann SD "Testing the importance of the retrosplenial navigation system: lesion size but not strain matters: a reply to Harker and Whishaw". *Neurosci Biobehav Rev* 28:525-531, (2004).
4. Akhondzadeh S, Rezaei F, Larijani B, Nejatisafa AA, Kashani L, Abbasi SH "Correlation between testosterone, gonadotropins and prolactin and severity of negative symptoms in male patients with chronic schizophrenia". *Schizophr. Res* 84:405-410, (2006).
5. Aleman A, Kahn RS "Strange feelings: do amygdala abnormalities dysregulate the emotional brain in schizophrenia?" *Prog Neurobiol.* 77 283-298, (2005).
6. Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA (2nd eds) "Amygdala and extended amygdala". Academic Press San Diego, CA, 495-578, (1995).
7. Alheid GF, Heimer L "New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata". *Neuroscience* 27:1-39, (1988).
8. Allen R, Young S "Phencyclidine induced psychosis". *Am. J. Psychiat* 135:1081-1084, (1978).
9. Amaral DG "The amígdala, social behavior, and danger detection". *Ann N Y Acad Sci.* 1000:337-347, (2003).
10. Amaral DG, Insausti R "Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex". *Exp Brain Res.* 88:375-388, (1992).
11. Andersen JD, Pouzet B "Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine". *Neuropsychopharmacology* 29:1080-1090, (2004).
12. Andiné P, Widermark R, Axelson R, Nyberg G, Olofsson G, Martenson E, Sandberg M "Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 290:1393-1408, (1999).
13. Aston-Jones G, Delfs JM, Druhan J, Zhu Y "The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal". *Ann N Y Acad Sci.* 877:486-498, (1999).
14. Atkins JB, Chlan-Fourney J, Nye HE, Hiroi N, Carlezon WA, Nestler EJ "Region-specific induction of deltaFosB by repeated administration of typical versus atypical antipsychotic drugs". *Synapse* 33:118-128, (1999).
15. Auer R, Coulter K "The nature and time course of neuronal vacuolization induced by the NMDA antagonist". *Acta Neuropathol.* 87:1-7, (1994).
16. Auer RN "Effect of age and sex on N-Methyl-D-Aspartate antagonist-induced neuronal necrosis in rats". *Stroke* 27:743-746, (1996a).
17. Auer RN, Coupland SG, Jason GW, Archer DP, Payne J, Belzberg AJ, Ohtak iM, Tranmer BI "Postischemic therapy with MK-801 (dizocilpine) in a primate model of transient focal brain ischemia". *Mol Chem Neuropathol.* 29:193-210, (1996b).
18. Bakshi V, Swerdlow N, Geyer M "Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response". *J Pharmacol Exp Ther* 271:787-794, (1994).
19. Bakshi VP, Geyer MA "Antagonism of phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition by the putative atypical antipsychotic olanzapine". *Psychopharmacology*

- 122:198-201, (1995).
20. Bakshi VP, Geyer MA "Alpha-1-adrenergic receptors mediate sensorimotor gating deficits produced by intracerebral dizocilpine administration in rats". *Neuroscience* 92:113-121, (1999).
 21. Balster RL, Chait LD "The Behavioral Effects of Phencyclidine in Animals". *NIDA Res Monogr* 21:53-65, (1978).
 22. Becker JB, Hu M "Sex differences in drug abuse". *Front Neuroendocrinol* 29:36-47, (2008).
 23. Beckmann AM, Wilce PA "Egr transcription factors in the nervous system". *Neurochem Int* 31:477-510, (1997).
 24. Beilschowsky M Silberimpregnation der neurofibrillen. *J. Psicol. Neurol.* 3:169-188, (1904).
 25. Beltramino CA, de Olmos JS, Gallyas F, Heimer L, Zaborszky L (1993) Silver impregnation methods as a foundation for neurotoxic assessment. *NIDA Res Monogr.* 136:
 26. Bender C, de Olmos S, Manzini F, Heimer L, de Olmos JS The use of amino-cupric-silver method for the impregnation of somatodendritic and terminal axon degeneration in the central nervous system of animal models of excitotoxicity and schizophrenia, and after acute and subchronic binge ethanol administration. *Society for Neuroscience San Diego*, p 455.453, (2005).
 27. Bolam JP "Preparation of Central nervous system tissue for light and electron microscopy". Oxford University Press New York, USA, (1992).
 28. Braff DL, Geyer MA "Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies". *Arch Gen Psychiatry* 47:181-188, (1990).
 29. Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR "Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies". *Psychopharmacology* 156:234-258, (2001).
 30. Braff DL, Grillon C, Geyer MA "Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic-patients". *Arch Gen Psychiatry* 49:206-215, (1992).
 31. Breiter HC, Rosen BR "Functional magnetic resonance imaging of brain reward circuitry in the human". *Ann N Y Acad Sci* 877:523-547, (1999).
 32. Buckwalter JA, Schumann CM, Van Hoesen GW "Evidence for direct projections from the basal nucleus of the amygdala to retrosplenial cortex in the Macaque monkey". *Exp Brain Res* 186:47-57, (2008).
 33. Bueno A, de Olmos S, Heimer L, de Olmos JS "NMDA-Antagonist MK-801 induced neuronal degeneration in Wistar rat brain detected by the amino-cupric silver method" *Exp. Toxicol. Pathol.* 54:319-334, (2003a).
 34. Bueno A, de Olmos S, Manzini M, Desmond N, de Olmos JS "Strain Differences in the neurotoxic sequelae of MK801 visualized with the amino-cupric silver method". *Exp Toxic Pathol* 55:287-294, (2003b).
 35. Buterbaugh GG "Estradiol replacement facilitates the acquisition of seizures kindled from the anterior neocortex in female rats". *Epilepsy Res.* 4:207-215, (1989).
 36. Cain DP, Humpartzoomian R, Boon F "Retrosplenial cortex lesions impair water maze strategies learning or spatial place learning depending on prior experience of the rat. *Behav Brain Res.* 170:316-325, (2006).
 37. Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ "Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degron domains and implications for DeltaFosB stability". *Eur J Neurosci.* 25:3009-3019, (2007).
 38. Carlsson A, Hansson LO, Waters N, Carlsson ML "A glutamatergic deficiency model of

- schizophrenia". *Br J Psychiatry Suppl.* 37:2-6, (1999).
39. Cassell MD, Freedman LJ, Shi C "The intrinsic organization of the central extended amygdala". *Ann N Y Acad Sci* 877:217-241, (1999).
 40. Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ "Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study". *J Comp Neurol* 246:478-499, (1986).
 41. Cochran SM, McKerchar CE, Morris BJ, Pratt JA "Induction of differential patterns of local cerebral glucose metabolism and immediate-early genes by acute clozapine and haloperidol". *Neuropharmacology* 43:394-407, (2002).
 42. Cohen BM, Cherkerzian S, Ma J, Ye N, Wager C, Lange N "Cells in midline thalamus, central amygdala, and nucleus accumbens responding specifically to antipsychotic drugs". *Psychopharmacology* 167:403-410, (2003).
 43. Corbett D "Possible abuse potential of the NMDA antagonist MK-801". *Behav Brain Res* 34:239-246, (1989).
 44. Corso TD, Sesma MA, Tenkova TI, Der TC, Wozniak DF, Farber NB, Olney JW "Multifocal brain damage induced by phencyclidine is augmented by pilocarpine". *Brain Res.* 752:1-14, (1997).
 45. Cyr M, Ghribi O, Di Paolo T "Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain". *J. Neuroendocrinol* 12:445-452, (2000).
 46. Cyr M, Ghribi O, Thibault C, Morissette M, Landry M, Di Paolo T "Ovarian steroids and selective EB receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors". *Brain Res. Rev.* 37:153-161, (2001).
 47. Chen J, Kelz MB, Hope BT, Nakabeppu Y, Nestler EJ "Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments". *J Neurosci.* 17:4933-4941, (1997).
 48. Church J, Zeman S, Lodge D "The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats". *Anesthesiology* 69:702-709, (1988).
 49. D'Souza DN, Harlan RE, Garcia MM "Sexual dimorphic effect of morphine and MK-801: sex steroid-dependent and -independent mechanism". *J Appl Physiol* 92:493-503, (2002).
 50. Danscher G "Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the silver sulfide method suitable for both light and electron microscopy". *Histochemistry* 71:1-16, (1981).
 51. Davis M, Shi C "The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety?" *Ann N Y Acad Sci* 877:281-291, (1999).
 52. de Olmos JS "A cupric silver method for impregnation of terminal axon degeneration and its further use in staining granular argyrophilic neurons". *Brain Behavior and Evolution* 2:213-238, (1969).
 53. de Olmos JS "The amygdala projection field in the rat brain as studied with the cupric-silver method". en "The Neurobiology of the amygdala". Ed. B.E. Eleftheriou, Plenum Press Plenum Press New York USA, pag:145-204 (1972).
 54. de Olmos JS "Amygdala". Capítulo 20 en: "The Human Nervous System". Ed. G. Paxinos. Academic Press, Australia, pag: 583-710, (1990).
 55. de Olmos JS, Alheid GF, Beltramino CA "Amygdala" en "The Rat Nervous System" Ed. G. Paxinos, Academic Press Australia, pag:223-224, (1985).
 56. de Olmos JS, Beltramino C, Alheid G "Amygdala and Extended Amygdala" en "The Rat Nervous System", 3er ed, Editor: G. Paxinos, Academic Press, pag. 509-603, (2004).
 57. de Olmos JS, Beltramino CA, de Olmos S "An Amino-Cupric-Silver Method for the

- early detection of degenerative and regressive changes in neuronal perikarya, dendrites, stem-axons and axon terminals caused by neurotoxicants and hypoxia". *Neurotoxicol Teratol.* 16:545-561, (1994).
58. de Olmos JS, Ebbesson SOE, Heimer L "Silver methods for the impregnation of degenerating axoplasm" en "Neuroanatomical Tract-tracing Methods" Ed.Heimer,L. and RoBards, M.J., Plenum Press,pags. 117-170, (1981).
 59. de Olmos JS, Ingram WR "An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration". *Brain Research* 33:523-529, (1971).
 60. de Olmos JS, Ingram WR "The projection field of the stria terminalis in the rat brain. An experimental study". *J Comp Neurol* 146:303-333, (1972).
 61. Domino EF "Neurobiology of phencyclidine (sernyl), a drug with an unusual spectrum of pharmacological activity". *Int Rev Neurobiol* 6:303-347, (1964).
 62. Dribben W, Nemmers B, Nardi A, Taylor G, Olney J, 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).
 63. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy KS, Wise PM "EB receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:1952-1957, (2001).
 64. Ellison G "Neuronal degeneration following both competitive and non-competitive NMDA antagonists". *Neuroreport* 5:2688-2692, (1994).
 65. Ellison G "The NMDA antagonist phenciclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias". *Brain Res. Rev* 20:250-267, (1995).
 66. Epstein J, Stern E, Silbersweig D "Mesolimbic activity associated with psychosis in schizophrenia. Symptom-specific PET studies". *Ann N Y Acad Sci.* 877:562-574 (1999).
 67. Epstein RA "Parahippocampal and retrosplenial contributions to human spatial navigation". *Trends Cogn Sci* 12:388-396, (2008).
 68. Farber NB "The NMDA receptor hypofunction model of psychosis". *Ann N Y Acad Sci* 1003:119-130, (2003).
 69. Farber NB, Foster J, Duhan NL, Olney JW " α_2 Adrenergic agonists prevent MK-801 neurotoxicity". *Neuropsychopharmacology* 12:347-349, (1995).
 70. Farber NB, Hanslick J, Kirby C, McWilliams L, Olney JW "Serotonergic agents that activate 5HT_{2A} receptors prevent NMDA antagonist neurotoxicity". *Neuropsychopharmacology* 18:57-62, (1998).
 71. Farber NB, Kim SH, Dikranian K, Jiang XP, Heinkel C "Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity". *Mol Psychiatry.* 7:32-43, (2002).
 72. Farber NB, Wozniak DF, Price MT, Labruyere J, Huss J, St Peter H, Olney JW "Age-specific neurotoxicity in the rat associated with NMDA receptor blockade:potential relevance to schizophrenia". *Biol Psychiatry* 38:788-796, (1995).
 73. Fendt M, Schwienbacher I, Koch M "Amygdaloid N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid(A) receptors regulate sensorimotor gating in a dopamine-dependent way in rats". *Neuroscience* 98:55-60, (2000).
 74. Fix AS, Horn JW, Wightman KA, Johnson CA, Long GG, Storts RW, Farber N, Wozniak DF, 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).
 75. Fix AS, Ross J, Stitzel SR, 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).

76. Fix AS, Wozniak DF, Truex LL, McEwen M, Miller JP, 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. Frederickson CJ, Kasarskis EJ, Ringo D, Frederickson RE "A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain". *J Neurosci Methods.* 20:91-103, (1987).
78. Freedman LJ, Cassell MD "Distribution of dopaminergic fibers in the central division of the extended amygdala of the rat". *Brain Res Bull* 633:243-252, (1994).
79. Fujimura M, Hashimoto K, 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).
80. Gao XM, Hashimoto T, Tamminga CA "Phencyclidine (PCP) and dizocilpine (MK801) exert time-dependent effects on the expression of immediate early genes in rat brain". *Synapse* 29:14-28, (1998).
81. Gass P, Herdegen T, Bravo R, 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, (1993a).
82. Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M "Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: effects of NMDA receptor antagonist MK-801". *Eur J Neurosci.* 5:933-943, (1993b).
83. Gazzaley AH, Weiland NG, McEwen BS, Morrison JH "Differential regulation of NMDAR1 mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus". *J. Neurosci.* 16:6830-6838, (1996).
84. Geyer M, Segal D, Greenberg B "Increased startle responding in rats treated with phencyclidine". *Neurobehav Toxicol Teratol* 6:161-164, (1984).
85. Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR "Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review". *Psychopharmacology* 156:117-154, (2001).
86. Geyer MA, Swerdlow NR, Mansbach RS, Braff DL "Startle response models of sensorimotor gating and habituation deficits in schizophrenia". *Brain Res Bull* 25:485-498, (1990).
87. Gioiosa L, Chen X, Watkins R, Klanfer N, Bryan tCD, Evans CJ, Arnold AP "Sex chromosome complement affects nociception in tests of acute and chronic exposure to morphine in mice". *Horm Behav.* 53:124-130, (2008).
88. Gioiosa L, Chen X, Watkins R, Umeda EA, Arnold AP "Sex chromosome complement affects nociception and analgesia in newborn mice". *J Pain.* 9:962-969, (2008).
89. Giovannini MG "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).
90. Glees P "Terminal degeneration within the central nervous system as studied by a new silver method". *J Neuropathol Exp Neurol* 5:54-59, (1946).
91. Gonchar Y, Burkhalter A "Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex". *Cereb Cortex* 7:347-358, (1997).
92. Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A "Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining". *Front Neuroanat* 1:3, (2007)
93. Graeme K "New drugs of abuse". *Emerg Med Clin North Am* 18:625-636, (2000).
94. Griffiths R, Grieve A, Scollon J, Scott M, Williams C, Meredith C "Preliminary evaluation of an in vitro test for assessment of excitotoxicity by measurement of early gene (c-fos mRNA) levels". *Toxicol In Vitro* 14:447-458, (2000).
95. Griffiths R, Malcolm C, Ritchie L, Frandsen A, Schousboe A, Scott M, Rumsby P,

- Meredith C "Association of c-fos mRNA expression and excitotoxicity in primary cultures of mouse neocortical and cerebellar neurons". *J Neurosci Res* 48:533-542, (1997).
96. Grove EA "Neural associations of the substantia innominata in the rat: afferent connections". *J Comp Neurol*. 277:315-346, (1988a).
 97. Grove EA "Efferent connections of the substantia innominata in the rat". *J Comp Neurol* 277:347-364, (1988b).
 98. Handa RJ, Roselli CE, Horton L, Resko JA "The quantitative distribution of cytosolic androgen receptors in microdissected areas of the male rat brain: effects of EB treatment". *Endocrinology* 233-240, (1987).
 99. Harker KT, Whishaw IQ "Impaired spatial performance in rats with retrosplenial lesions: importance of the spatial problem and the rat strain in identifying lesion effects in a swimming pool". *J Neurosci*. 22:1155-1164, (2002).
 100. Hasegawa M, Yamada K, Hasegawa T, Nabeshima T "Role of dopaminergic neuronal system in dizocilpine-induced acetylcholine release in the rat brain". *J Neural Transm* 103:651-660, (1996).
 101. Hashimoto K, Fujita Y, Shimizu E, Iyo M "Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol". *Eur J Pharmacol*. 519:114-117, (2005).
 102. Heimer L, Harlan RE, Alheid GF, Garcia MM, de Olmos JS "Substantia innominata: a notion which impedes clinical-anatomical correlations in neuropsychiatric disorders". *Neuroscience* 76:957-1006, (1997).
 103. Heizmann CW, Braun K "Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders". *Trends Neurosci*. 15:259-264, (1992).
 104. Herdegen T, Leah JD "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins". *Brain Res Brain Res Rev* 28:370-490, (1998).
 105. Hiramatsu M, Cho AK, Nabeshima T "Comparison of the behavioral and biochemical effects of the NMDA receptor antagonists, MK-801 and phencyclidine". *Eur J Pharmacol*. 166:359-366, (1989).
 106. Hiroi N, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, Nestler EJ "FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10397-10402, (1997).
 107. Hom AC, Buterbaugh GG "EB alters the acquisition of seizures kindled by repeated amygdala stimulation or pentylene tetrazol administration in OVX female rats". *Epilepsia* 27:103-108, (1986).
 108. Hönack D, Löscher W "Sex differences in NMDA receptor mediated responses in rats". *Brain Res*. 620:167-170, (1993).
 109. Honkaniemi J, Sharp FR "Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures". *Eur J Neurosci*. 11:10-17, (1999).
 110. Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ "Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments". *Neuron*. 13:1235-1244, (1994).
 111. Horvath ZC "MK-801-induced neuronal damage in rats". *Brain Res*. 753:181-195, (1997).
 112. Hur GH, Son WC, Shin S, Kang JK, Kim YB "Sex differences in dizocilpine (MK801) neurotoxicity in rats". *Environm. Toxicol. Pharmacol* 7:143-146, (1999).
 113. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI,

- Stefovska V, Turski L, Olney JW "Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain". *Science* 283:70-74, (1999).
114. Jansen K Ketamine: Dreams and Realities. Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies, (2004).
 115. Jansen KLR "A review of the non-medical use of ketamine: use, users and consequences". *J Psychoactive Drugs* 32: 419-433, (2000).
 116. Jansen KLR, Darracot-Cancovic R (2001) The nonmedical use of ketamine, part two: A review of problem use and dependence. *J Psychoactive Drugs* 33:151-158.
 117. Jansen KLR, Theron L "Ketamina: Nuevas observaciones sobre su consumo, consumidores y efectos". *Adicciones* 15:135-166, (2003).
 118. Javitt DC "Management of negative symptoms of schizophrenia". *Curr Psychiatry Rep* 3:413-417, (2001).
 119. Javitt DC, Zukin SR "Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia". *American Journal of Psychiatry* 148:1301-1308, (1991).
 120. Jentsch JD, Anzivino LA "A low dose of the alpha2 agonist clonidine ameliorates the visual attention and spatial working memory deficits produced by phencyclidine administration to rats". *Psychopharmacology* 175:76-83, (2004).
 121. Jentsch JD, Roth RH "The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia". *Neuropsychopharmacology* 20:201-225, (1999).
 122. Johnson AK, de Olmos JS, Pastuskovas CV, Zardetto-Smith AM, Vivas L "The extended amígdala and salt appetite". *Ann N Y Acad Sci* 877:258-280, (1999).
 123. Johnson KM "Neurochemical pharmacology of phencyclidine". *NIDA Res Monogr* 21:44-52, (1978).
 124. Kaminska B, Kaczmarek L, Chaudhur IA "Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in visual cortex". *J Neurosci.* 16:3968-3978, (1996).
 125. Keene CS, Bucci DJ "Damage to the retrosplenial cortex produces specific impairments in spatial working memory". *Neurobiol Learn Mem* Dec 9, (2008).
 126. Kelz MB, Nestler EJ "deltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity". *Curr Opin Neurol* 13:715-720, (2000).
 127. Kemp JA, Foster AC, Wong EHF "Non-competative antagonists of excitatory amino-acid receptors". *TINS* 10:294-298, (1987).
 128. Kempainen S, Pitkänen A "Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid". *J Comp Neurol.* 426:441-467, (2000).
 129. Kim SH, Price M, Olney JW, Farber NB "Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by GABAergic and α_2 -adrenergic agonists". *Mol. Psychiatry* 4:344-352, (1999).
 130. Knapska E, Kaczmarek L "A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK" *Prog Neurobiol.* 74:183-211, (2004).
 131. Ko YH, Jung SW, Joe S, Lee CH, Jung HG, Jung IK, Kim SH, ., Lee MS "Association between serum testosterone levels and the severity of negative symptoms in male patients with chronic schizophrenia". *Psychoneuroendocrinology* 32:385-391, (2007).
 132. Koch M "The neurobiology of startle". *Prog Neurobiol.* 59:107-128, (1999).
 133. Koek W, Woods J, Winger G "MK-801, a proposed non-competitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produced phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 245:969-974, (1988).
 134. Kontkanen O, Lakso M, Koponen E, Wong G, Castrén E "Molecular effects of the psychotropic NMDA receptor antagonist MK-801 in the rat entorhinal cortex: increases

- in AP-1 DNA binding activity and expression of Fos and Jun family members". *Ann N Y Acad Sci.* 911:73-82, (2000).
135. Koob GF "Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala". *Eur Neuropsychopharmacol.* 13:442-452, (2003).
 136. Kovács KJ "c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map". *Neurochem Int.* 33:287-297, (1998).
 137. Krystal JH, D'Souza DC, Karper JP, Bennett A, Abi-Dargham A, Abi-Saab D, Cassello K, Bowers MB, Vegso S, Heninger GR, Charney DS "Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans". *Psychopharmacology* 145:193-204, (1999).
 138. Krystal JH, Karper LP, Seiby IJP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Charney DS "Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses". *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214, (1994).
 139. Kus L, Handa R, Sanderson J, Kerr J, Beitz A "Distribution of NMDAR1 receptor subunit mRNA and MK-801 binding in the hypothalamus of intact, castrate and castrate-DHTP treated male rats". *Mol. Brain Res Brain Res.* 28:55-60, (1995).
 140. Kus L, Handa RJ, Hautman JM, Beitz AJ "Castration increases [¹²⁵I]MK-801 binding in the hippocampus of male rats". *Brain Res.* 683:270-274, (1995).
 141. Lahti AC, Weiler MA, Michaelidis T "Effects of ketamine on normal and schizophrenic volunteers". *Neuropsychopharmacology* 25:455 -467, (2001).
 142. LeDoux JE "Emotion circuits in the brain". *Annu Rev Neurosci.* 23:155-184, (2000).
 143. Lewis DA, Moghaddam B "Cognitive dysfunction in schizophrenia: convergence of gamma-aminobutyric acid and glutamate alterations". *Arch Neurol.* 10:1372-1376, (2006).
 144. Lilly JC "The Scientist". Ronin Publishing; 3rd edition (1978).
 145. Linn GS, Negi SS, Gerum SV, C. JD "Reversal of phencyclidine-induced prepulse inhibition deficits by clozapine in monkeys". *Psychopharmacology* 169:234-239, (2003).
 146. Liotti M, Mayberg HS "The role of functional neuroimaging in the neuropsychology of depression". *J Clin Exp Neuropsychol* 23:121-136, (2001).
 147. Livingston A, Waterman AE "The development of tolerance to ketamine in rats and the significance of hepatic metabolism". *Br J Pharmacol* 64:63-69, (1978).
 148. Lua AC, Lin HR, Tseng YT, Hu AR, Yeh PC "Profiles of urine samples from participants at rave party in Taiwan: prevalence of ketamine and MDMA abuse". *Forensic Sci Int* 136:47-51, (2003).
 149. Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R "Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl". *AMA Arch Neurol Psychiatry* 81:363-369, (1959).
 150. Ma J, Ye N, Cohen BM "Expression of noradrenergic alpha1, serotonergic 5HT2a and dopaminergic D2 receptors on neurons activated by typical and atypical antipsychotic drugs". *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30:647-657, (2006).
 151. Ma J, Ye N, Lange N, Cohen BM "Dynorphinergic GABA neurons are a target of both typical and atypical antipsychotic drugs in the nucleus accumbens shell, central amygdaloid nucleus and thalamic central medial nucleus". *Neuroscience* 121:991-998, (2003).
 152. Maddock RJ "The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain". *Trends Neurosci.* 22:310-316, (1999).
 153. Maddock RJ, Garrett AS, Buonocore MH "Posterior cingulate cortex activation by emotional words: fMRI evidence from a valence decision task". *Hum Brain Mapp* 18:30-41, (2003).
 154. Maguire EA "The retrosplenial contribution to human navigation: a review of lesion and

- neuroimaging findings". *Scand J Psychol.* 42:225-23, (2001).
155. Malhotra AK, Pinal DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, Breier A "Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics". *Neuropsychopharmacology* 17:141-150, (1997).
 156. Malhotra AK, Pinal DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A "NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers". *Neuropsychopharmacology* 14:301-307, (1996).
 157. Manahan-Vaughan D, von Haebler D, Winter C, Juckel G, 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).
 158. Mandillo S, Rinaldi A, Oliverio A, Mele A "Repeated administration of phencyclidine, amphetamine and MK801 selectively impairs spatial learning in mice: a possible model of psychotomimetic drug-induced cognitive deficits". *Behav Pharmacol* 14:533-544, (2003).
 159. McClung CA UP, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ "DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain". *Brain Res Mol Brain Res* 132:146-154, (2004).
 160. McDonald AJ "Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat". *J Comp Neurol.* 208:401-418, (1982).
 161. McDonald AJ "Neurons of the bed nucleus of the stria terminalis: a golgi study in the rat". *Brain Res Bull.* 10:111-120, (1983).
 162. McDonald AJ "Cortical pathways to the mammalian amígdala". *Prog Neurobiol.* 55:257-332, (1998).
 163. McDonald AJ, Shammah-Lagnado S, Shi C, Davis M "Cortical afferents to the extended amígdala". *Ann N Y Acad Sci* 877:309-338, (1999).
 164. Mechri A, Saoud M, Khiari G, d'Amato T, Dalery J, Gaha L "Glutamatergic hypothesis of schizophrenia: clinical research studies with ketamine". *Encephale* 27:53-59, (2001).
 165. Moga MM, Saper CB, Gray TS "Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat". *J Comp Neurol.* 283:315-332, (1989).
 166. Moghaddam B, Adams BW "Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats". *Science* 281:1349-1352, (1998).
 167. Moghaddam B, Adams BW, Verma A, 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).
 168. Moghaddam B, Jackson ME "Glutamatergic animal models of schizophrenia". *Ann N Y Acad Sci* 1003:131-137, (2003).
 169. Moore KA, Sklerov J, Levine B, Jacobs AJ "Urine concentrations of ketamine and norketamine following illegal consumption". *J Anal. Toxicol* 25:583-588, (2001).
 170. Moratalla R, Vallejo M, Elibol B, Graybiel AM "D1-class dopamine receptors influence cocaine-induced persistent expression of Fos-related proteins in striatum". *Neuroreport* 8:1-5, (1996).
 171. Morgan CJ, Mofeez A, Brandner B, Bromley L, Curran HV "Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers". *Neuropsychopharmacology* 29:208-218, (2004).
 172. Morgan CJ, Muetzelfeldt L, 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).
 173. Morris TA, Jafari N, DeLorenzo RJ "Chronic DeltaFosB expression and increased AP-1

- transcription factor binding are associated with the long term plasticity changes in epilepsy". *Res Mol Brain Res.* 79:138-149, (2000).
174. Mouri A, Noda Y, Enomoto T, Nabeshima T "Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment". *Neurochem. Int.* 51:173-184, (2007).
 175. Mozayani A, Schrode P, Carter J, Danielson TJ "A multiple drug fatality involving MK801 (dizocilpine), a mimic of phencyclidine". *Forensic Science International* 133:113-117, (2003).
 176. Murphy CA, Russig H, Pezze MA, Ferger B, Feldon J "Amphetamine withdrawal modulates FosB expression in mesolimbic dopaminergic target nuclei: effects of different schedules of administration". *Neuropharmacology* 44:926-939, (2003).
 177. Murphy D, Cole N, Greenberger V, Segal M "Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons". *J. Neurosci.* 18:2550-2559, (1998).
 178. Murray EA, Mishkin M "Amygdalectomy impairs crossmodal association in monkeys". *Science* 228:604-606, (1985).
 179. Nabeshima T, Kitaichi K, Noda Y "Functional changes in neuronal systems induced by phencyclidine administration". *Ann N Y Acad Sci.* 801:29-38, (1996).
 180. Nabeshima T, Yamaguchi K, Furukawa H, Kameyama T "Role of sex hormones in sex-dependent differences in phencyclidine-induced stereotyped behaviors in rats". *Eur. J. Pharmacol.* 105:197-206, (1984).
 181. Nabeshima T, Yamaguchi K, Yamada K, Hiramatsu M, Kuwabara Y, Furukawa H, Kameyama T "Sex-dependent differences in the pharmacological actions and pharmacokinetics of phencyclidine in rats". *Eur. J. Pharmacol.* 97:217-227, (1984).
 182. Nakki R, Koistinaho J, Sharp FR, Sagar SM "Cerebellar toxicity of phencyclidine". *J Neurosci.* 15:2097-2108, (1995).
 183. Nakki R, Nickolenko J, Chang J, Sagar SM, Sharp FR "Haloperidol prevents ketamine- and phencyclidine-induced HSP70 protein expression but not microglial activation". *Exp Neurol.* 137:234-241, (1996).
 184. Nauta WJ, Gyax PA "Silver impregnation of degenerating axon terminals in the central nervous system:(1) Technic. (2) Chemical notes". *Stain Technol.* 26:5-11, (1951).
 185. Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan HJ "Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study". *Arch Gen Psychiatry.* 55:433-440, (1998).
 186. Nestler EJ "Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction". *Nat Rev Neurosci* 2:119-128, (2001).
 187. Nestler EJ, Kelz MB, Chen J "DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity". *Brain Res.* 835:10-17, (1999).
 188. Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Olney JW "Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis". *Neuropsychopharmacology* 20:106-118, (1999).
 189. Newcomer JW, Krystal JH "NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans". *Hippocampus* 11:529-542, (2001).
 190. Noguchi KK, Nemmers B, Farber NB "Age has a similar influence on the susceptibility to NMDA antagonist-induced neurodegeneration in most brain regions". *Brain Res. Dev. Brain Res.* 158:82-91, (2005).
 191. Nye HE, Hope BT, Kelz MB, Iadarola M, Nestler EJ "Pharmacological studies of the regulation of chronic FOS-related antigen induction by cocaine in the striatum and nucleus accumbens". *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 275:1671-1680, (1995).
 192. Nye HE, Nestler EJ "Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic

- morphine administration". *Mol Pharmacol* 49:636-645, (1996).
193. Olney J, Farber NB "Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia". *Arch gen psychiatry* 52:998-1024, (1995).
 194. Olney J, Labruyere J, Price M "Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs". *Science* 244:1360-1362, (1989).
 195. Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA "NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention". *Science* 254:1515-1518, (1991).
 196. Olney JW, Newcomer JW, Farber NB "NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia". *J. Psychiatr. Res.* 33:523-533, (1999).
 197. Park CK, Nehls DG, Graham DI, Teasdale GM, McCulloch J "The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat". *Ann Neurol.* 24:543-551, (1988).
 198. Paxinos G, Watson C "The rat brain stereotaxic coordinates". Academic press, (2007).
 199. Pennypacker KR, Hong JS, McMillian MK "Implications of prolonged expression of Fos-related antigens". *Trends Pharmacol Sci* 16:317-321, (1995).
 200. Pennypacker KR, Kassed CA, Eidizadeh S, O'Callaghan JP "Brain injury: prolonged induction of transcription factors". *Acta Neurobiol Exp* 60:515-530, (2000).
 201. Pennypacker KR, Thai L, Hong JS, McMillian MK "Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainate treatment". *J Neurosci Methods.* 14:3998-4006, (1994).
 202. Perrotti LI, Bolaños CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M "DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment". *Eur J Neurosci.* 21:2817-2824, (2005).
 203. Perrotti LI, Hadeishi Y, Ulery PG, Barrot M, Monteggia L, Duman RS, Nestler EJ "Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress". *J Neurosci.* 24:10594-10602, (2004).
 204. Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S, Elmore RG, Knapp DJ, Selley DE, Martin BR, Sim-Selley L, Bachtell RK, Self DW, Nestler EJ "Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse". *Synapse* 62:358-369, (2008).
 205. Pfaus JG, Heeb MM "Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents". *Brain Res Bull.* 44:397-407, (1997).
 206. Pinna A, Morelli M "Differential induction of Fos-like-immunoreactivity in the extended amígdala after haloperidol and clozapine". *Neuropsychopharmacology* 21:93-100, (1999).
 207. Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A "Reciprocal connections between the amígdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat". *Ann N Y Acad Sci* 911:369-391, (2000).
 208. Pitkänen A, Savander V, LeDoux JE "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amígdala". *Trends Neurosci.* 20:517-523, (1997).
 209. Pouliot WA, Handa RJ, Beck SG "Androgen modulates N-methyl-D-aspartate-mediated depolarization in CA1 hippocampal pyramidal cells". *Synapse* 23:10-19, (1996).
 210. Price JL "Comparative aspects of amígdala connectivity". *Ann N Y Acad Sci.* 985:50-58, (2003).
 211. Qi C, Zou H, Zhang R, Zhao G, Jin M, Yu L "Age-related differential sensitivity to MK-801-induced locomotion and stereotypy in C57BL/6 mice". *Eur J Pharmacol.* 580:161-168, (2008).

212. Reich DL, Silvey G "Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience". *Can J Anaesth* 36:186-197, 1989.
213. Reier CE "Ketamine - 'dissociative agent' or hallucinogen?". *New England Journal of Medicine* 284: 791-792, (1971).
214. Rieck RW, Carey RG "Organization of the rostral thalamus in the rat: evidence for connections to layer I of visual cortex". *J Comp Neurol.* 234:137-154, (1985).
215. Rodríguez JJ, García DR, Nakabeppu Y, Pickel VM "Enhancement of laminar FosB expression in frontal cortex of rats receiving long chronic clozapine administration". *Exp Neurol.* 168:392-401, (2001).
216. Rogers A, Schmuck G, Scholz G, Griffiths R, Meredith C, Schousboe A, Campiani G, Williams DC "Improvements in an in-vitro assay for excitotoxicity by measurement of early gene (c-fos mRNA) levels". *Arch Toxicol.* 79:129-139, (2005).
217. Rudick CN, Woolley CS "Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in the adult female rat". *J Neurosci.* 21:6532-6543 (2001).
218. Sato K, Morimoto K, Okamoto M "Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy". *Brain Res.* 463:12-20,(1988).
219. Schmued LC, Albertson C, Slikker W "Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration". *Brain Res.* 751:37-46, (1997).
220. Schmued LC, Hopkins KJ "Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration". *Brain Res* 874:123-130, (2000).
221. Schneider F, Weiss U, Kessler C, Salloum JB, Posse S, Grodd W, Müller-Gärtner HW "Differential amygdala activation in schizophrenia during sadness". *Schizophr Res* 34:133-142, (1998).
222. Schwaber JS, Sternini C, Brecha NC, Rogers WT, Card JP "Neurons containing calcitonin gene-related peptide in the parabrachial nucleus project to the central nucleus of the amygdala". *J Comp Neurol.* 270:416-426, 398-419, (1988).
223. Shammah-Lagnado S, Beltramino CA, McDonald A, Miselis R, Yang M, de Olmos JS, Heimer L, Alheid G "Supracapsular bed nucleus of the stria terminalis contains central and medial extended amygdala elements". Evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *J Comp Neurol.* 422:533-555, (2000).
224. Shan Y, Carlock LR, Walker PD "NMDA Receptor overstimulation triggers a prolonged wave of immediate early gene expression: relationship to excitotoxicity". *Experimental Neurology* 144:406-415, (1997).
225. Shannon BJ, Buckner RL "Functional-anatomic correlates of memory retrieval that suggest nontraditional processing roles for multiple distinct regions within posterior parietal cortex". *J Neurosci.* 24:10084-10092, (2004).
226. Sharp FR, Butman M, Aardalen K, Nickolenko J, Nakki R, Massa SM, Swanson RA, Sagar SM "Neuronal injury produced by NMDA antagonists can be detected using heat shock proteins and can be blocked with antipsychotics". *Psychopharmacol Bull.*; 30:555-560, (1994).
227. Sharp FR, Jasper P, Hall J, Noble L, Sagar SM "MK801 and ketamine induce heat shock protein hsp72 in injured neurons in posterior cingulate and retrosplenial cortex". *Ann. Neurol* 30:801-809, (1991).
228. Shelnett S, Gunnell M, Owens M "Sexual dimorphism in phencyclidine in vitro metabolism and pharmacokinetics in rats". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:1292-1298, (1999).
229. Shughrue PJ, Merchenthaler I "EB prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury". *Neuroscience* 116: 851-61 (2003).

230. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW "Distribution of androgen and EB receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study". *J Comp Neurol.* 294:76-95, (1990).
231. Sircar RT, Rappaport M, Nichtenhauser R, Zukin SR "The novel anticonvulsant MK801: a potent and specific ligand of the brain phencyclidine/o-receptor". *Brain Research* 435:235-241, (1987).
232. Slattery DA, Morrow JA, Hudson AL, Hill DR, Nut tDJ, Henry B "Comparison of alterations in c-fos and Egr-1 (zif268) expression throughout the rat brain following acute administration of different classes of antidepressant compounds". *Neuropsychopharmacology* 7:1278-1287, (2005).
233. Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI "Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo". *Nature* 363 166-169, (1993).
234. Smith MD, Jones LS, Wilson MA "Sex differences in hippocampal slice excitability: role of testosterone". *Neuroscience* 109:517-530, (2002).
235. Smith RJ, Aston-Jones G "Noradrenergic transmission in the extended amígdala: role in increased drug-seeking and relapse during protracted drug abstinence". *Brain Struct Funct* 213:43-61, (2008).
236. Snell L, Yi S, Johnson K "Comparison of the effects of MK801 and phencyclidine on catecholamine uptake and NMDA-induced norepinephrine release". *Eur. J. Pharmacol* 145:223-226, (1988).
237. Steinpreis RE "The behavioral and neurochemical effects of phencyclidine in humans and animals: some implications for modeling psychosis". *Behav Brain Res* 74:45-55, (1996).
238. Steinpreis RE, Kramer MA, Mix KS, Piwowarczyk MC "The effects of MK801 on place conditioning". *Neurosci Res* 22 427-430, (1995).
239. Stevens JR "Epilepsy, schizophrenia, and the extended amygdala". *Ann N Y Acad Sci.* 877:548-561, (1999).
240. Sturgeon RD, Fessler RG, London SF, Meltzer HY "Behavioral effects of chronic phencyclidine administration in rats". *Psychopharmacology* 76:52-56, (1982).
241. Sun N, Cassell MD "Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala". *J Comp Neurol.* 330:381-404, (1993).
242. Swerdlow NR, Geyer MA "Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia". *Pharmacol Biochem Behav* 44:741-744, (1993).
243. Tamminga CA "Similarities and differences among antipsychotics". *J Clin Psychiatry* 64:7-10, (2003).
244. Taylor SF, Liberzon I, Decker LR, Koeppe RA "A functional anatomic study of emotion in schizophrenia". *Schizophr Res.* 58:159-172, (2002).
245. Thiriet N, Zwiller J, Ali SF "Induction of the immediate early genes egr-1 and c-fos by methamphetamine in mouse brain". *Brain Res.* 919:31-40, (2001).
246. Tomitaka SI, Hashimoto K, Narita N, Minabe Y, Tamura A "Regionally different effects of scopolamine on NMDA antagonist-induced heat shockprotein HSP70". *Brain Res.* 763:255-258, (1997).
247. Vaisanen J, Ihalainen J, Tanila H, Castrén E "Effects of NMDA-receptor antagonist treatment on c-fos expression in rat brain areas implicated in schizophrenia". *Cell Mol Neurobiol.* 24:769-780, (2004).
248. Valenstein E, Bowers D, Verfaellie M, Heilman KM, Day A, Watson RT "Retrosplenial amnesia". *Brain.* 110:1631-1646, (1987).
249. Van Brederode JF, Helliesen MK, Hendrickson AE "Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k in the sensorimotor cortex of the rat".

- Neuroscience 44:157-171, (1991).
250. Van den Buuse M, Garner B, Koch M “Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition”. *Curr Mol Med.* 3:459-471, (2003).
 251. Van Groen T, Kadish I, Wyss JM “Retrosplenial cortex lesions of area Rgb (but not of area Rga) impair spatial learning and memory in the rat”. *Behav Brain Res.* 154:483-491, (2004).
 252. Van Groen T, Wyss JM “Connections of the retrosplenial granular a cortex in the rat”. *J Comp Neurol.* 300:593-606, (1990).
 253. Van Groen T, Wyss JM “Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat”. *J Comp Neurol* 315:200-216, (1992).
 254. Van Groen T, Wyss JM “Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat”. *J Comp Neurol.* 463:249-263, (2003).
 255. Vann S, Kristina Wilton L, Muir J, Aggleton J “Testing the importance of the caudal retrosplenial cortex for spatial memory in rats”. *Behav Brain Res.* 140:107-118, (2003).
 256. Vogt BA, Absher JR, Bush G “Human retrosplenial cortex: where is it and is it involved in emotion?” *Trends Neurosci.* 23:195-197, (2000).
 257. Vogt BA, Laureys S “Posterior cingulate, precuneal and retrosplenial cortices: cytology and components of the neural network correlates of consciousness”. *Prog Brain Res.* 150:205-217, (2005).
 258. Vogt BA, Miller MW “Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices”. *J Comp Neurol.* 216:192-210, (1983).
 259. Vogt BA, Peters A “Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: areas 32, 24, and 29”. *J Comp Neurol.* 195:603-625, (1981).
 260. Vogt BA, Vogt L, Farber NB “Cingulate cortex and disease models”. *The rat nervous system*, pp 705-728, (2004).
 261. von Zerssen GC, Mecklinger A, Opitz B, von Cramon DY “Conscious recollection and illusory recognition: an event-related fMRI study”. *Eur J Neurosci.* 13:2148-2156, (2001).
 262. Wass C, Archer T, Pålsson E, Fejgin K, Klamer D, Engel JA, Svensson L “Effects of phencyclidine on spatial learning and memory: nitric oxide-dependent mechanisms”. *Behav Brain Res* 171:147-153, (2006).
 263. Weiland NG “Estradiol selectivity regulates agonist binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor complex in the CA1 region of the hippocampus”. *Endocrinology* 131:662-668, (1992).
 264. Weiner AL, Vieira L, McKay CA, Bayer MJ “Ketamine abusers presenting to the Emergency Department: A case series”. *Journal of Emergency Medicine* 18:447-451, (2000).
 265. Weiss JH, Sensi SL “Ca²⁺-Zn²⁺ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration”. *Trends Neurosci.* 23:365-371, (2000).
 266. Wessinger WD “Sexual dimorphic effects of chronic phencyclidine in rats”. *Eur J Pharmacol.* 277:107-112, (1995).
 267. White PF, Way WL, Trevor AJ “Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses”. *Anesthesiology.* 56:119-136, (1982).
 268. Wolbers T, Büchel C “Dissociable retrosplenial and hippocampal contributions to successful formation of survey representations”. *J Neurosci.* 25:3333-3340, (2005).
 269. Wong E, Nielsen M “The N-methyl-D-aspartate receptor channel complex and the sigma site have different target sizes”. *Eur. J. Pharmacol.* 172:493-496, (1989).
 270. Wong EHF, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL “The anticonvulsant MK-801 is a potent NMDA antagonist”. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7104-7108, (1986).

271. Wong M, Moss RL "Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons". *J Neurosci.* 12:3217-3225, (1992).
272. Wong M, Moss RL "Patch-clamp analysis of direct steroidal modulation of glutamate receptor-channels". *J Neuroendocrinol* 6:347-355, (1994).
273. Woolley CS "Estradiol facilitates kainic acid-induced, but not flurothyl-induced, behavioral seizure activity in adult female rats". *Epilepsia* 41:510-515, (2000).
274. Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA "Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: Correlation with dendritic spine density". *J. Neurosci.* 17:1848-1859, (1997).
275. Worley PF, Christy BA, Nakabeppu Y, Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM "Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity". *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5106-5110, (1991).
276. Wozniak D, Dikranian K, Ishimaru M, Nardi A, Corso T, Tenkova T, Olney J, Fix A "Disseminated corticolimbic neuronal degeneration induced in rat brain by MK-801: Potential relevance to Alzheimer disease". *Neurobiol Dis* 5:305-322, (1998).
277. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET "Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia". *Am J Psychiatry* 157:16-25, (2000).
278. Wu A, Liu Y "Prolonged expression of c-Fos and c-Jun in the cerebral cortex of rats after deltamethrin treatment". *Brain Res Mol Brain Res* 110:147-151, (2003).
279. Wyss JM, Van Groen T, Sripanidkulchai K "Dendritic bundling in layer I of granular retrosplenial cortex: intracellular labeling and selectivity of innervation". *J Comp Neurol* 295:33-42, (1990).
280. Zajackowski W, Hetman M, Nikolaev E, Quack G, Danysz W, Kaczmarek L "Behavioural evaluation of long-term neurotoxic effects of NMDA receptor antagonists". *Neurotox Res.* 1:299-310, (2000).
281. Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M "c-fos regulates neuronal excitability and survival". *Nat Genet.* 30:416-420, (2002).
282. Zhang X, Fan X, Mohapel P, Yu PH, Boulton AA "MK-801-induced expression of Fos protein family members in the rat retrosplenial granular cortex". *J Neurosci Res.* 57:719-729, (1999).
283. Zhou L, Welsh AM, Chen D, Koliatsos VE "NMDA inhibitors cause apoptosis of pyramidal neurons in mature piriform cortex:evidence for a nitric oxide-mediated effect involving inhibitory interneurons". *Neuropharmacology* 52:1528-1537, (2007).

LINKS A WEBS RELACIONADAS

National Survey on Drug Use and Health; <http://www.samhsa.gov/>

NIDA: <http://www.drugabuse.gov/>

Monitoring the future survey: <http://www.drugabuse.gov/infofacts/hallucinogens.html>

ANEXO

Publicación en revista con referato interancional:

-de Olmos S, Bueno A, Bender C, Lorenzo A, de Olmos J “Sex differences and influence of gonadal hormones on MK801-induced neuronal degeneration in the granular retrosplenial cortex of the rat. *Brain Structure and Function*, 2008 Sep; 213 (1-2):229-38

Premios

NIDA international travel award. Premio otorgado por la “National institute of drug abuse” para viajar y presentar el trabajo “Neurotoxicity and immediate early gene expression in an animal model of schizophrenia” en el congreso de “NIDA international forum: international trends and needs in drug abuse research”. 13-17 de Junio, 2008 San Juan, Puerto Rico”.

-de Olmos, S y de Olmos, J. S “Neurotoxicidad y genes de expresión temprano en un modelo animal de esquizofrenia”. 9no congreso Argentino de Neuropsiquiatría y Neurociencia cognitiva. 5to Congreso Latinoamericano de Neuropsiquiatría, X Jornadas de la Enfermedad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos. Buenos Aires 5, 6 y7 de Septiembre de 2007. **PRIMERA MENCIÓN.**

NIDA international travel award. Premio otorgado por el “National institute of drug abuse” para viajar y presentar el trabajo “Immediate early gene expression in the rat amygdala and related brain structures after an acute administration of a non competitive NMDA antagonist drug” en el congreso de NIDA International Forum: International Trends and Needs in Drug Abuse Research. 16-19 de Junio, 2007 Quebec, Canada.”

NIDA international travel award. premio otorgado por el “National institute of drug abuse” para viajar y presentar un trabajo en el congreso “Neurotoxicity induced by the noncompetitive antagonist of the n- methyl-d-aspartate receptor (NMDA) MK801 in the rat retrosplenial cortex: a study of sexual dimorphic effects”. en el congreso de NIDA international forum: international trends and needs in drug abuse Research. 16-19 de Junio, 2006 Scottsdale Arizona, USA.”

Presentaciones de este trabajo a Congresos y Talleres Nacionales e Internacionales:

-de Olmos S., Bueno A.; Bender C., Manzini F. R., de Olmos J. S. “Análisis de los cambios de expresión de c-Fos, FosB y Calretinina en la amígdala extendida y estructuras asociadas después del tratamiento con MK801”. Sociedad Argentina de Neuroquímica XVII, los Cocos, Córdoba, Argentina, 23-25 Octubre, 2002.
Cellular and Molecular Neurobiology, ed. Juan Saavedra, Vol. 23 N. 2 A93 pag. 280, 2003.

-de Olmos S., Ortiz C., de Olmos J. S. “Efecto del estrógeno frente a la acción neurodegenerativa del MK801”. Sociedad Argentina de Neurociencia XVIII, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, 4-7 de Diciembre, 2004
Medicina, Vol. 64, Supl. II, No.95. Pag.103, 2004.

-de Olmos S., Bender C., de Olmos J. S. “Sexual dimorphic effects in the neurotoxicity induced by MK801 in the rat retrosplenial cortex”. SAN XX annual meeting, PABMBM

10th congress, SAIB XLI annual meeting. Pinamar, Buenos Aires Argentina, Dic 3-6 2005.

BIOCELL Vol 29. Supplement .TX-P7, pag. 237, 2005.

-de Olmos, S., Bender, C., de Olmos, J S. “Neurotoxicity induced by the non-competative anatonistof the N- methyl-d-aspartate receptor (NMDA) MK801 in the rat retrosplenial cortex: A study of sexual dimorphic effects”. NIDA International Forum: International Trends and Needs in Drug Abuse Research. Scottsdale Arizona, USA. June 16-19, 2006

-de Olmos, S.; Bender, C., de Olmos, J. S.: “Análisis neuroanatómico de los efectos dimorficos del MK801 en un modelo animal de esquizofrenia”. XXI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias, Los Cocos, Córdoba, Argentina, 23-26 de Noviembre, 2006

-de Olmos S; de Olmos J. S. “Neurotoxicidad y genes de expresión temprano en un modelo animal de esquizofrenia”. 9no Congreso Argentino de neuropsiquiatría y neurociencia cognitiva, 5to congreso latinoamericano de neuropsiquiatría, X jornadas de la enfermedad de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos. Buenos Aires, Argentina 5-7 de Septiembre de 2007.