



Cinvestav

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SEDE SUR**

Departamento de Farmacobiología

Efectos de la administración repetida de minociclina sobre la transmisión sináptica
hipocámpal

Presenta

QFBT Gabriela Rocha Botello

Para obtener el grado de Maestra en ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de Tesis:

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa

Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo

Este trabajo se realizó en los laboratorios 9 y 10 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados bajo la tutoría del Dr. Emilio Galván Espinosa y la Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología a través del proyecto CB-281617 (EJGE) y de la beca de maestría No 1010748.

ÍNDICE

Índice de figuras	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	i
Abstract	1
1. Introducción	1
Transmisión sináptica	1
Transmisión glutamatérgica	2
Gliotransmisión	7
Hipocampo	8
Procesos de plasticidad en el Hipocampo	10
Papel del glutamato en la plasticidad sináptica	13
Síntesis de proteínas y plasticidad	15
Antibióticos y plasticidad	16
Minociclina	17
Efectos no antibióticos	19
Mecanismo de acción	22
2. Planteamiento del problema	25
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
5. Materiales y métodos	26
Declaración ética	26
Animales	27
Tratamiento subcrónico con minociclina	27

Obtención de cortes de hipocampo.....	27
Registros electrofisiológicos de campo	28
Protocolos de registro electrofisiológico.....	29
Curva de entrada y salida	29
Inducción de potenciación a largo plazo dependiente de GluR	29
Inducción de depresión a largo plazo dependiente de GluR.....	30
Análisis estadístico.....	30
6. Resultados	31
La minociclina modifica la excitabilidad y la fuerza de transmisión en las Colaterales de Schaffer – CA1 en hipocampo de ratas	33
<i>Espigas poblacionales</i>	33
<i>Potenciales postsinápticos excitadores</i>	33
La minociclina disminuye la magnitud de la potenciación a largo plazo (LTP) en la sinapsis colaterales de Schaffer – CA1.....	36
La minociclina altera la inducción de depresión a largo plazo (LTD) en la sinapsis colaterales de Schaffer – CA1.....	38
7. Discusión	40
Alteraciones en la excitabilidad y la fuerza de transmisión sináptica producidas por la MN	40
La disminución de la magnitud de la LTP dependiente de NMDA producida por la MN.....	42
El comportamiento bifásico de la LTD dependiente de NMDA producido por la MN	45
8. Conclusiones	47
9. Perspectivas.....	48
10. Referencias	50

Índice de figuras

Figura 1. Tipos de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato

Figura 2. Representación de un receptor NMDA.

Figura 3. Circuito sináptico del Hipocampo. Vías del circuito trisináptico del hipocampo y las células y regiones que lo conforman, así como la dirección de la transmisión sináptica.

Figura 4. Distribución del cuerpo neuronal por estratos y la distribución de los estratos en el hipocampo.

Figura 5. Activación de receptores de glutamato en la LTP y LTP.

Figura 6. Activación de receptores NMDA y AMPA.

Figura 7. Efectos antibióticos y no antibióticos generales de la MN.

Figura 8. Actividad basal de NFkB.

Figura 9. Posicionamiento de los electrodos para el registro electrofisiológico.

Figura 10. La minociclina disminuye la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1.

Figura 11. La minociclina disminuye la fuerza de transmisión sináptica de las Colaterales de Schaffer - CA1.

Figura 12. La minociclina disminuye la magnitud de la potenciación a largo plazo en las Colaterales de Schaffer - CA1.

Figura 13. La minociclina produce alteraciones en la inducción de la depresión a largo plazo en las Colaterales de Schaffer - CA1.

Abreviaturas

CA – Cuerpo de Amón	GLAST - Transportador de glutamato y aspartato
MN – Minociclina	GLT - Transportador glial de glutamato
EPSP – Potencial post sináptico excitador	EAAT – Transportadores de aminoácidos excitadores
SP – Espiga poblacional	PK – Proteína cinasa
PA – Potencial de acción	Glu N – Proteína conformacional N-terminal del receptor NMDA
HFS – Estimulación de alta frecuencia	GD – Giro dentado
LFS – Estimulación de baja frecuencia	CG – Célula granular / Células granulares
Curva I-O Curva de Entrada y salida	CE – Corteza entorrinal
PTP – Potenciación post tetánica	EO - Estrato Oriens
BH – Barrera hematoencefálica	EP – Estrato Piramidal
DPN – Días postnatales	ER – Estrato Radiatum
GLUT – Transportadores de glutamato	EL-M Estrato Lacunoso Molecular
VGLUT – Transportador vesicular de glutamato	LTP – Potenciación a largo plazo
NMDA - N-metil-D-aspartato	LTD – Depresión a largo plazo
AMPA - α -amino-3-hidroxi-5metil-4-ácido isoxazol propiónico	CAMKII - Ca ²⁺ /calmodulina cinasa II
NMDG - N-Metil-D-glucamina	PSD – Densidad post-sináptica
AK – Ácido Kinurénico	SNC – Sistema Nervioso Central

FDA – Asociación de la administración de alimentos y fármacos

NFκB – Factor de nuclear de transcripción κB

MMPs – Metaloproteasa de la matriz extracelular

Fmr1 – Gen que codifica para FMRP

FMRP – Proteína del retraso mental frágil

MAP – Proteína activada por mitógeno

BDNF – Factor neurotrófico derivado del cerebro

PP2B - Proteína fosfatasa-calcineurina altamente sensible a Ca²⁺

PP1 - Proteína fosfatasa-1

Resumen

La minociclina (MN) es una tetraciclina de amplio espectro que actualmente se utiliza poco como tratamiento (tx) de enfermedades inflamatorias. Es un compuesto con propiedades antiinflamatorias, quelante de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} . Es pequeño y altamente lipofílico, y puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y alcanzar al sistema nervioso central (SNC). La MN se ha propuesto para el tx de enfermedades neurodegenerativas con resultados prometedores. Sin embargo, se han obtenido resultados inconsistentes e inesperados debido a la variación en los distintos estudios en cuanto a dosis, vía de administración, duración del tratamiento y estado o región cerebral analizada. Pocos trabajos han evaluado los efectos de la MN en estados no patológicos o en cerebros inmaduros, altamente plásticos. El hipocampo, una estructura vulnerable al cambio y necesaria para la consolidación de la memoria y el aprendizaje, permite el estudio de la plasticidad. En este trabajo se hicieron registros extracelulares de hipocampo de rebanadas de cerebro de ratas adolescentes de 21 días postnatales (DPN) administradas durante dos semanas con 50mg/kg de MN o vehículo p.o. En las colaterales de Schaffer-CA1 se evaluó la fuerza de la transmisión sináptica mediante curvas I/O y se estudiaron los cambios en los procesos de plasticidad sináptica (LTD y LTP). El tx con MN disminuyó la amplitud de espigas poblacionales y del potencial postsináptico excitador de CA1. De igual manera, la MN disminuyó la magnitud de la LTP y produjo aberraciones en la inducción de la LTD. Estos resultados sugieren la MN afecta la integridad de la sinapsis glutamatérgica dependiente de receptores NMDA y la señalización intracelular dependiente de Ca^{+} , procesos indispensables para la integridad neuronal.

Abstract

Minocycline (MN) is a tetracycline broad spectrum antibiotic rarely used as treatment of inflammatory disease but highly used as neuroprotector on preclinical trials. It is a small and highly lipophilic antibiotic and anti-inflammatory compound chelating of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} and Zn^{2+} . MN is able to pass through blood brain barrier (BBB) to reach the central nervous system (CNS) and has been used as a treatment of neurodegenerative disease with promising results. However, other results have been unexpected and variable. This could be because of the variation of dosage, administration route, treatment time and previous status of the brain or cerebral region. Few studies have tested MN on non-inflammatory state or immature brains, which have increased plasticity. The hippocampus, a structure with elevated plasticity structure, vulnerable to change and necessary for consolidation of learning and memory, turns out to be an excellent structure to study plasticity. In this work we tested slices obtained from the brains of young rats (21 postnatal days PND) under the oral administration of 50 mg/kg/day of MN or vehicle for two weeks. We measured the excitability and the synaptic transmission strength of Schaffer Collaterals – CA1 by extracellular recording to know the effects of MN on plasticity synaptic process (LTP and LTD). Our results show MN decreases the amplitude of population spikes and excitatory postsynaptic potential on CA1. MN exhibited LTP reduced and impairments on LTD induction. These results suggest the sub-chronic use of MN alters the Ca^{2+} -dependent signaling and provide evidence for the disruption of NMDA-dependent synaptic integrity, a vital process for neuronal function.

1. Introducción

El objetivo de este trabajo fue identificar cambios en la transmisión sináptica en el hipocampo de ratas frente a la administración subcrónico oral de 50 mg/kg/día de minociclina (1 vez al día, 7 días a la semana durante dos semanas) en ratas adolescentes. Al término del tratamiento farmacológico, se realizó un estudio electrofisiológico de campo en la región CA1 del hipocampo para analizar las alteraciones electrofisiológicas del circuito hipocampal, así como los procesos de plasticidad sináptica mediados por receptores a glutamato. La MN alteró la fuerza de la transmisión glutamatérgica y las capacidades plásticas de la región CA1. En los siguientes apartados se presentan los fundamentos más relevantes para el planteamiento del proyecto.

Transmisión sináptica

La comunicación entre células cerebrales se conoce como transmisión sináptica, y la región donde se genera el relevo de información eléctrica y transformado en información química es la sinapsis. La sinapsis química puede ser de transmisión rápida, si está mediada por receptores ionotrópicos (acoplados a canales iónicos) o lenta, si es por receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G). La transmisión sináptica está mediada por la liberación de neurotransmisores; estos se sintetizan y almacenan en *vesículas sinápticas* almacenadas en la *zona activa* de la sinapsis. Esta zona es una estructura de la membrana altamente especializada donde las vesículas se unen y segregan al neurotransmisor en la *hendidura sináptica*.

Un engrosamiento de la membrana postsináptica da lugar a la *densidad postsináptica*, donde se concentrará la hendidura sináptica que contendrá elementos proteicos y moléculas de adhesión necesarias para la liberación del

neurotransmisor. La liberación del neurotransmisor y el vaciamiento de las vesículas sucede por exocitosis mediada por Ca^{2+} que a su vez activa el influjo de Ca^{2+} extracelular y es capaz de producir cambios en la membrana celular evocando potenciales de acción. Tras la liberación presináptica y acople a receptores postsinápticos, la membrana celular cambia su permeabilidad debido al tránsito iónico lo que modifica el voltaje (Meldrum , 2000).

El cambio de voltaje por intercambio iónico determina si la membrana se hiperpolariza (potencial de membrana más negativo) o se despolariza (potencial de membrana más positivo). El potencial que despolariza la membrana es llamado *potencial postsináptico excitador (EPSP, por sus siglas en inglés)*. El EPSP acerca a la neurona al umbral de activación de canales de Na^+ para evocar un potencial de acción (PA). Los EPSPs se asocian a cambios en la permeabilidad de Na^+ y Ca^{2+} (corrientes entrantes positivas) y salida de K^+ . El potencial que aleja a la neurona del umbral del PA se llama *potencial postsináptico inhibidor (IPSP, por sus siglas en inglés)*. Los IPSPs disminuyen la probabilidad de generar un PA y se asocian con el incremento en la permeabilidad de la membrana a iones Cl^- y incremento en la permeabilidad de iones K^+ (Meldrum , 2000; Luobon Ortega & Franco, 2010).

Transmisión glutamatérgica

El glutamato, además de formar parte de las rutas metabólicas esenciales, es el principal neurotransmisor excitador del SNC. Se sintetiza a partir de la glucosa en sangre que ingresa atravesando la barrera hematoencefálica (BH) y es capturada por la familia de transportadores de glutamato (GLUT) presentes en neuronas, astrocitos y células endoteliales. La síntesis de glutamato tiene lugar en las neuronas y en los astrocitos, aunque en estos últimos es limitada.

Las neuronas glutamatérgicas sintetizan glutamato a partir de lactato para formar piruvato que a su vez se convierte en acetil coenzima A. Esta coenzima se une

con metabolitos como el oxaloacetato y esta unión da lugar a un acetoácido, el α -cetoglutarato. Finalmente, un grupo amino se transfiere al acetoácido y da lugar a glutamato. Cuando el glutamato se metaboliza, da lugar a la glutamina, y ésta puede convertirse en GABA por descarboxilación mediante la enzima descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) (Medina Marín & Betancourth, 2002). El glutamato se almacena en las vesículas sinápticas y, una vez liberado, se recaptura a través de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT).

Las vesículas liberan glutamato cuando se fusionan con la membrana presináptica a través de un sistema de anclaje que se activa por el aumento intracelular de Ca^{2+} y en el que participa un grupo de proteínas especializadas llamadas SNARE. En este grupo encontramos proteínas como la sinaptotagmina (que funciona como un sensor de Ca^{2+}), la sinaptobrevina (que reconoce a la membrana presináptica), la sinaptofisina (que forma el poro de fusión), y otras como la sintaxina (que reconoce la membrana vesicular) y la SNAP-25 (que funciona como sensor de distintas proteínas) (Medina Marín & Betancourth, 2002; Meldrum, 2000).

Cuando el glutamato se libera en la hendidura sináptica se acopla a receptores de membrana específicos, los receptores a glutamato. Los receptores a glutamato son conformaciones proteicas tetraméricas o pentaméricas con subunidades específicas para cada tipo de receptor que determinan las propiedades biofísicas y sus variables farmacológicas.

Dentro de los receptores ionotrópicos, que son los de principal interés para este trabajo, tenemos 3 familias nombradas así por sus agonistas; NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5metil-4-ácido isoxazol propiónico) y kainato. La función del receptor está determinada por 4 dominios polipeptídicos:

1. Dominio extracelular amino (N) terminal.
2. Dominio de unión para el ligando.

3. Región transmembranal, formada por segmentos membranales homofóbicos (M1 a M4) donde M2 forma el canal iónico.
4. Dominio carboxilo (C) intracelular.

También hay 3 clases de receptores metabotrópicos a glutamato (mGluR), los cuales vemos resumidos de manera general en la figura 1.

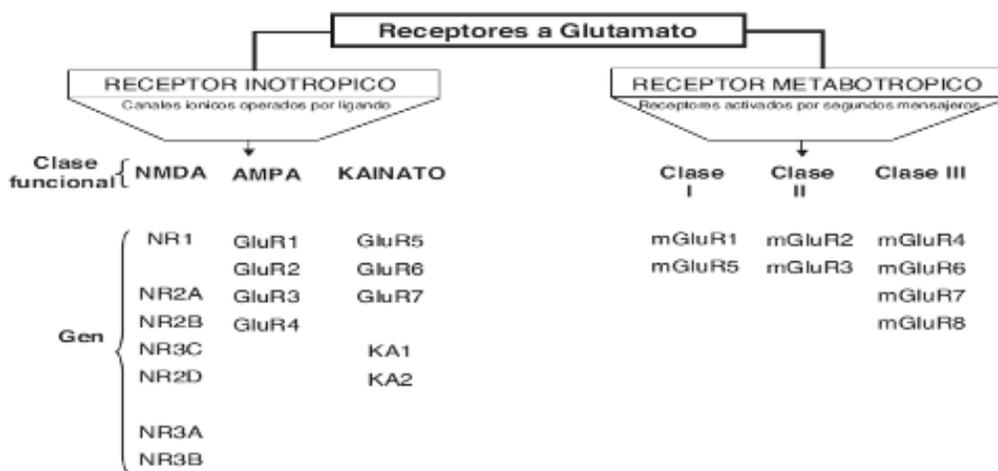


Figura 1. Tipos de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato. Modificada de Flores-Soto, et al., 2012.

Una vez que el glutamato se libera a la hendidura sináptica se inicia el EPSP y la fusión de una sola vesícula es suficiente para producirlo (Flores-Soto, et al., 2012). El glutamato liberado puede ser movilizado por transportadores que lo recapturan para su reciclaje o incluso que lo liberan. Se han descrito 5 transportadores de glutamato, pero solo dos de estos se expresan de manera prominente en células gliales: el GLAST (transportador glial de glutamato y aspartato) y el GLT (transportador glial de glutamato). En neuronas los transportadores de glutamato son los transportadores de aminoácidos excitadores EAAT3 (EAAC en rata), el EAAT4 y el EAAT5. Estos transportadores son dependientes del flujo de Na⁺; de

hecho, los gradientes de Na^+ y K^+ proveen la energía necesaria para activar el transporte de glutamato (Flores-Soto, et al., 2012; Meldrum , 2000). Los transportadores gliales tienen una distribución espacial específica: el GLT se expresa predominante en el hipocampo de rata mientras que el GLAST se encuentra en mayor cantidad en cerebelo (Meldrum, 2000).

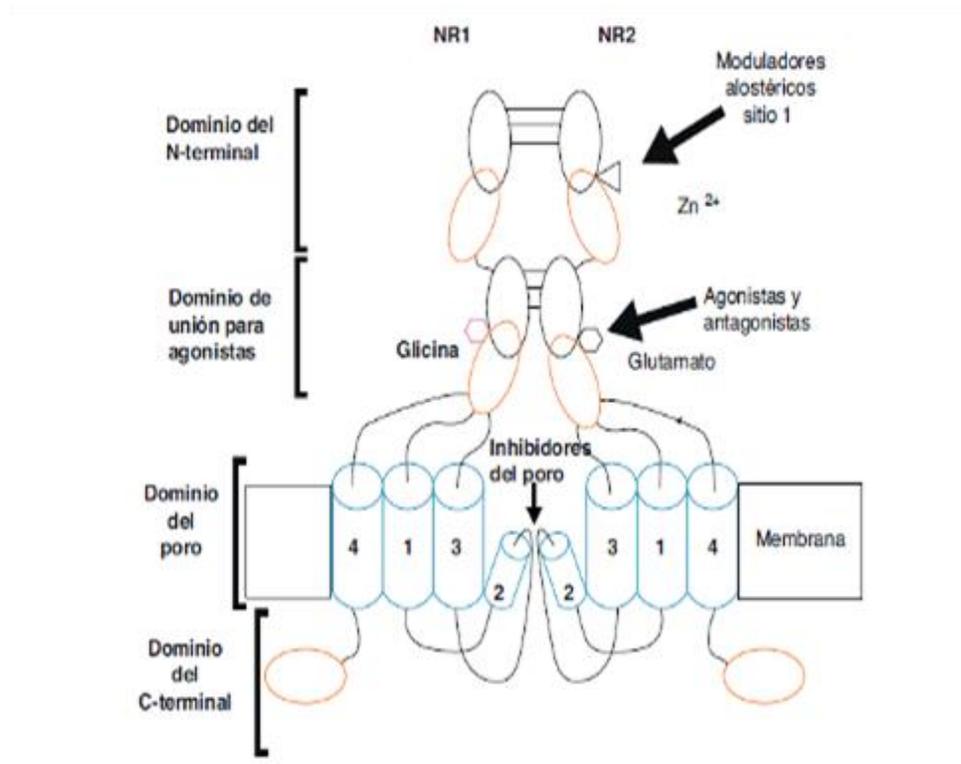


Figura 2. Representación de un receptor NMDA. Estructura proteica general del receptor NMDA con dominios y sitios de regulación, modificada de Flores-Soto, et al., 2012.

Para este proyecto los receptores a glutamato de mayor interés son los receptores tipo NMDA porque están íntimamente ligados a procesos de plasticidad. Otros receptores a glutamato, tanto ionotrópicos como metabotrópicos, también desempeñan papel fundamental en la sinapsis.

Los receptores NMDA funcionales comprenden un heterotetrámero integrado por dos dímeros conformados por la distinta combinación de 3 subunidades. Comúnmente el NMDA es una combinación de dos subunidades, la subunidad NR1 (con hasta 8 subtipos, comprende el sitio de unión a la glicina S1) y la subunidad NR2 (con 4 subtipos A-D, comprende el sitio de unión a glutamato S2) (Figura 2). La tercera, la subunidad NR3 (2 subtipos A-B) se piensa se incorpora a los dímeros por las combinaciones de NR1 y NR2 para formar complejos terciarios (Paoletti & Neyton, 2007). La subunidad NR1 no se expresa de forma homogénea durante el desarrollo. En los primeros 14 días postnatales aumenta su expresión de manera gradual hasta llegar los 21 días postnatales, cuando se estabiliza. La subunidad NR1, regula algunas de las propiedades del canal como su sensibilidad al pH y a iones como el Zn^{+} . Los mecanismos que regulan la cantidad y la densidad de receptores NMDA en la sinapsis puede diferir ampliamente de acuerdo a los exones expresados en el receptor (Flores-Soto, et al., 2012). La subunidad NR2, en sus distintas variantes A, B, C y D, es determinante para la sensibilidad, la conductancia, la cinética de activación y la desensibilización del receptor y esto influye directamente en la duración de las corrientes del EPSP. La subunidad NR2B se expresa con mayor densidad en el cerebro anterior, en el estriado y en el cerebelo en neonatos, y su expresión se ve aumentada alrededor de las primeras 4 semanas después del nacimiento, después de este tiempo, la cantidad de NR2B disminuye. La función de la subunidad está regulada por su fosforilación y por los aminoácidos de la región C-terminal que determinan la interacción con proteínas PDZ (dominios conservados para el reconocimiento de proteínas). Algunas proteínas cinasas (PK) como la PKC y la PKA, fosforilan residuos de estas subunidades. La expresión de esta subunidad ejerce influencia directa en el umbral de activación, modulación y duración de corrientes excitadoras (Flores-Soto, et al., 2012). El glutamato juega un papel fundamental en la actividad sináptica y no solo produce respuestas neuronales, también produce respuestas en otros componentes cerebrales.

Gliotransmisión

La glía conforma más de la mitad de las células del cerebro humano, se encargan de la integridad neuronal y es participante activa de la neurotransmisión (Ota, et al., 2013). Dentro de las células gliales encontramos a los astrocitos que dan soporte a la BH y son las células gliales de mayor tamaño; la microglía, que censa los patrones moleculares asociados a daño y patógenos y los oligodendrocitos que forman la mielina en las terminales axónicas (Reyes-Haro, et al., 2014). Una de las principales funciones de los astrocitos y la microglia es mantener la homeostasis iónica (Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+) y responder a la liberación de neurotransmisores (Ota, et al., 2013). Los astrocitos y la microglia son las células protectoras del SN, al activarse pueden tener un perfil proinflamatorio o inmunorregulador.

La expresión de receptores de glutamato tipo NMDA en la glía ha sido evidenciada a partir de experimentos que muestran la expresión de subunidades del receptor NMDA en astrocitos corticales. Las células gliales expresan las subunidades GluN1, GluN2A y GluN3 (Verkhratsky & Kirchhoff, 2007). Los receptores NMDA se activan en respuesta a la liberación neuronal o glial de glutamato, promoviendo vías excitadoras en la comunicación neuronal. La glía también modula la recaptura del glutamato y expresa GLAST y GLT. Por cada molécula de glutamato acoplado se cotransporta una molécula de Na^+ , esto de forma simultánea reduce el K^+ por contratransporte. Estos transportadores tampoco tienen una distribución homogénea, por ejemplo, GLT es altamente expresado en el hipocampo de rata (Meldrum, 2000).

Existe una diferencia importante entre los receptores NMDA neuronales y gliales. Los gliales tienen un menor grado de sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} , mientras que los neuronales necesitan de la unión de glutamato y de una despolarización inicial para que el Mg^{2+} sea desplazado. En los astrocitos, los receptores NMDA pueden operar o activarse incluso en potenciales negativos incluyendo el potencial

en reposo (Verkhatsky & Kirchhoff, 2007). Sin embargo, la activación de estos receptores es incapaz de despolarizar a la neurona y desplazar el bloqueo por Mg^{2+} . Esta característica los vuelve altamente sensibles al aumento en las concentraciones de glutamato e hiperactivación de sus receptores, es decir, la excitotoxicidad inducida por glutamato (Verkhatsky & Kirchhoff, 2007).

Hipocampo

El hipocampo es una estructura anatómica que integra información sensorial de todo tipo y las neuronas que lo conforman son en su mayoría glutamatérgicas. El hipocampo es, en realidad, uno de los componentes de la formación hipocampal, una región que recibe información altamente procesada, multimodal y de varias fuentes neocorticales.

La formación hipocampal está conformada por el giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho (conformado por las regiones CA3, CA2 y CA1), el subiculum, el presubiculum, el parasubiculum y la corteza entorrinal. Esta última es el inicio del circuito intrínseco hipocampal donde las neuronas superficiales proyectan sus axones al GD para dar lugar a la principal aferencia del hipocampo: la vía perforante. Las principales células del GD son células granulares (CG). Los axones de las CG (fibras musgosas) se conectan con las neuronas piramidales de CA3 (Figura 3).

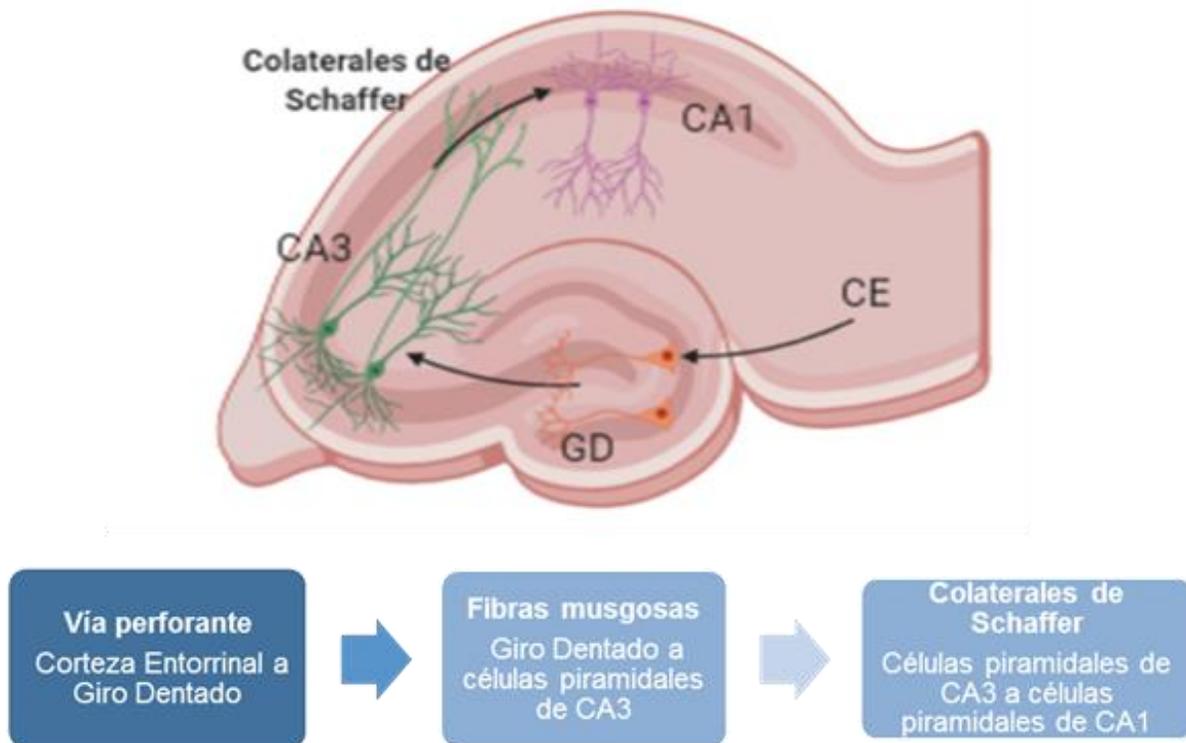


Figura 3. Circuito sináptico del Hipocampo. Vías del circuito trisináptico conformadas por la conexión de los axones neuronales de la CE y su contacto con las células granulares del GD que a su vez se proyectan y hacen sinapsis con los axones de las células piramidales de CA3 y éstas hacen sinapsis con las neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas de CA1.

En el siguiente relevo sináptico, las neuronas de CA3 originan una serie de axones (colaterales de Schaffer) que viajan a la región CA1 y son la principal aferencia glutamatérgica de CA1 (Figura 3) (Anderser, et al., 2007). Del mismo modo, encontramos otros circuitos neuronales con proyección de CA1 al subiculum. A partir de este punto las conexiones comienzan a ser más complejas. El subiculum envía señales aferentes al presubiculum, al subiculum y a la corteza entorrinal; a través de estas conexiones se cierra el ciclo de procesamiento en la formación hipocámpal que comienza en la capa superficial de la corteza entorrinal y termina en las capas más profundas del hipocampo (Anderser, et al., 2007).

El hipocampo posee una organización laminar única, la principal capa laminar está compuesta por neuronas piramidales. La capa piramidal es muy compacta en la región CA1 y en menor medida en CA2 y CA3 dando lugar a diferentes regiones llamadas estratos. El primer estrato conforma una capa angosta con muy pocas células ubicadas en la profundidad de las dendritas basales piramidales (capa infra piramidal) llamado *estrato Oriens* (EO). La segunda capa, situada por encima de las piramidales sin somas y estrecha, el *estrato Lucidum* (EL) ocupado por las fibras musgosas. Por encima de esta capa, encontramos el *estrato Radiatum* (ER) ubicado en lo más superficial del EL. El ER es la región donde se encuentran las conexiones asociativas de CA3 y de CA3 a CA1, las colaterales de Schaffer. La capa más superficial es el estrato *Lacunoso-molecular* (EL-M) donde terminan las fibras de la corteza entorrinal (Anderser, et al., 2007). En la Figura 4 se muestra la distribución de una neurona piramidal en los distintos estratos y la distribución de estos en el hipocampo.

Procesos de plasticidad en el Hipocampo

La plasticidad sináptica representa el proceso fisiológico que subyace a la memoria y su principal característica es que puede modificar la sinapsis a partir de la experiencia. Cuando se sobre-estimula una motoneurona, por ejemplo, sus sinapsis pueden modificarse a partir de esta experiencia y desensibilizar esta respuesta. A este fenómeno se le conoce como *habituación* donde la magnitud de la respuesta decrece a estimulaciones repetidas.

Cuando se aplica un estímulo y existe un intervalo de tiempo tal que al siguiente estímulo la respuesta no decrece se le conoce como *recuperación espontánea* (Rudy, 2014). En el hipocampo, sucede algo muy interesante, Bliss y Lomo en 1973 realizaron un experimento donde aplicaron un estímulo en la corteza entorrinal misma que evocó una respuesta sináptica en el GD.

Cuando aplicaron un segundo estímulo con la misma intensidad y en la misma región, éste evocó una respuesta de mayor intensidad a la primera y al aplicar un tercer estímulo de menor intensidad la respuesta siguió creciendo. Esto demostró que en el hipocampo las respuestas pueden potenciarse y este aumento puede permanecer durante horas, fenómeno ahora conocido como potenciación a largo plazo o LTP.

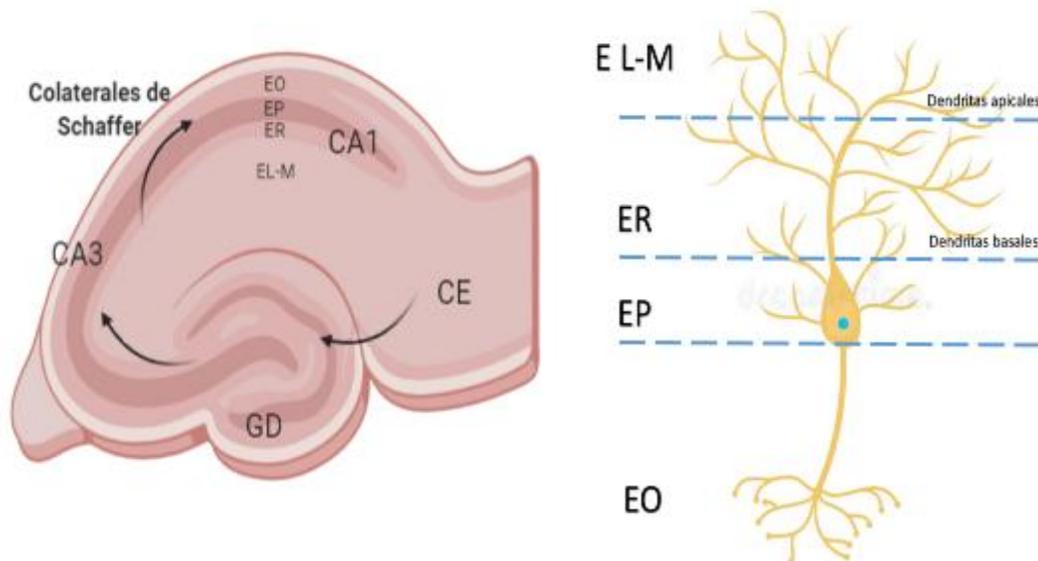


Figura 4. Distribución del cuerpo neuronal por estratos y la distribución de los estratos en el hipocampo. Observamos de lado izquierdo la distribución estratificada en un corte transversal de hipocampo. De lado derecho el cuerpo de una neurona piramidal y su disposición en los estratos. E L-M: estrato Lacunos Molecular conformado principalmente por dendritas apicales, ER: estrato Radiatum conformado principalmente por las dendritas basales, EP: estrato piramidal conformado por los somas, EO: estrato Oriens conformado por los axones.

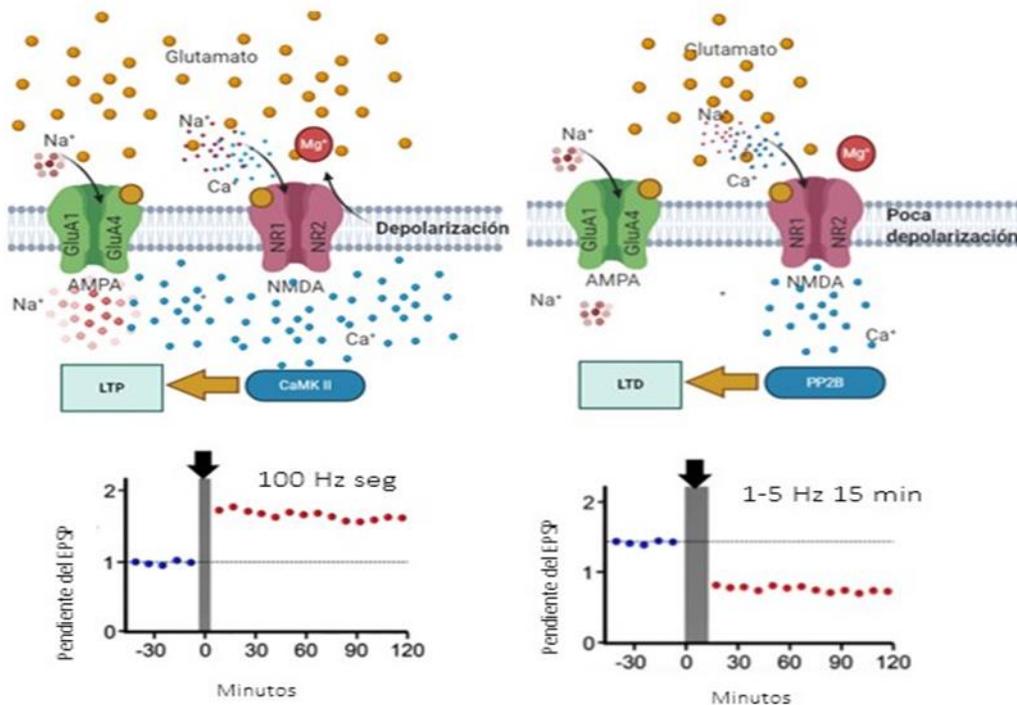


Figura 5. Activación de receptores de glutamato en la LTP y LTD. En el lado izquierdo de la imagen, se puede observar la activación de los receptores AMPA que permiten el influjo de Na⁺ y despolarizan la membrana activando a los receptores NMDA. Estos permiten la activación de las reservas intracelulares de Ca⁺ y al activar su influjo se activan algunas cinasas como la CaMKII (inducción de LTP). En el lado derecho se observa que también existe un aumento en el influjo de Na⁺, sin embargo, este es pequeño en comparación con el aumento en la LTD, lo que activa en menor medida los receptores NMDA que, aunque aumentan la concentración intracelular de Ca⁺, esta permanece modesta y sostenida produciendo la activación de fosfatasas como la PP2B (inducción de LTD).

Lo más común hoy en día ha sido explorar otras áreas del hipocampo, en especial la sinapsis glutamatérgica de las colaterales de Schaffer, haciendo el registro en de los axones de CA3 y su proyección a CA1. La estimulación eléctrica puede

inducir LTP generando potenciales de acción en los axones de las neuronas emisoras. Este proceso aumenta la fuerza de conexiones sinápticas; sin embargo, la experiencia también puede debilitar estas conexiones, la estimulación eléctrica a baja frecuencia induce este cambio en la sinapsis, la depresión a largo plazo. Esto nos habla de que la plasticidad no sólo modifica las sinapsis, sino que los cambios pueden ser bidireccionales y de corta o larga duración (Rudy, 2014).

Papel del glutamato en la plasticidad sináptica

Los mecanismos moleculares para la inducción de plasticidad han sido ampliamente estudiados en la región CA1. La inducción de LTP y LTD requiere patrones específicos de actividad e involucra la activación de receptores NMDA (Lüscher & Malenka, 2012).

Por tal razón, los elementos necesarios para la inducción y expresión de LTP se encuentran en la neurona postsináptica, donde se localizan, entre otros, los receptores a glutamato ionotrópicos (NMDA y AMPA) y metabotrópicos. La LTD puede inducirse a través de la activación repetida de la presinapsis a baja frecuencia (1-5 Hz por 5-15min) (Lüscher & Malenka, 2012) sin actividad postsináptica. En condiciones de reposo, el receptor NMDA posee un sitio de unión a Mg^{2+} en el interior del canal. Es un receptor de lenta activación y dependiente de voltaje pues, para permitir el paso de Ca^{2+} necesita que el bloqueo de Mg^{2+} sea removido, lo cual se logra con una despolarización inicial.

Cuando hay una estimulación de alta frecuencia (trenes de pulsos de entre 50-100 Hz) (Figura 5) (Lüscher & Malenka, 2012), se produce la liberación de glutamato que se une a receptores AMPA y, al activarlos, permite la apertura de canales de Na^+ produciendo la despolarización necesaria para la remoción del Mg^{2+} (Figura 6).

Los receptores AMPA también desempeñan un papel crítico en la inducción de potenciación sináptica, pues ésta depende de la entrada de Na^+ a través de estos receptores (Rudy, 2014).

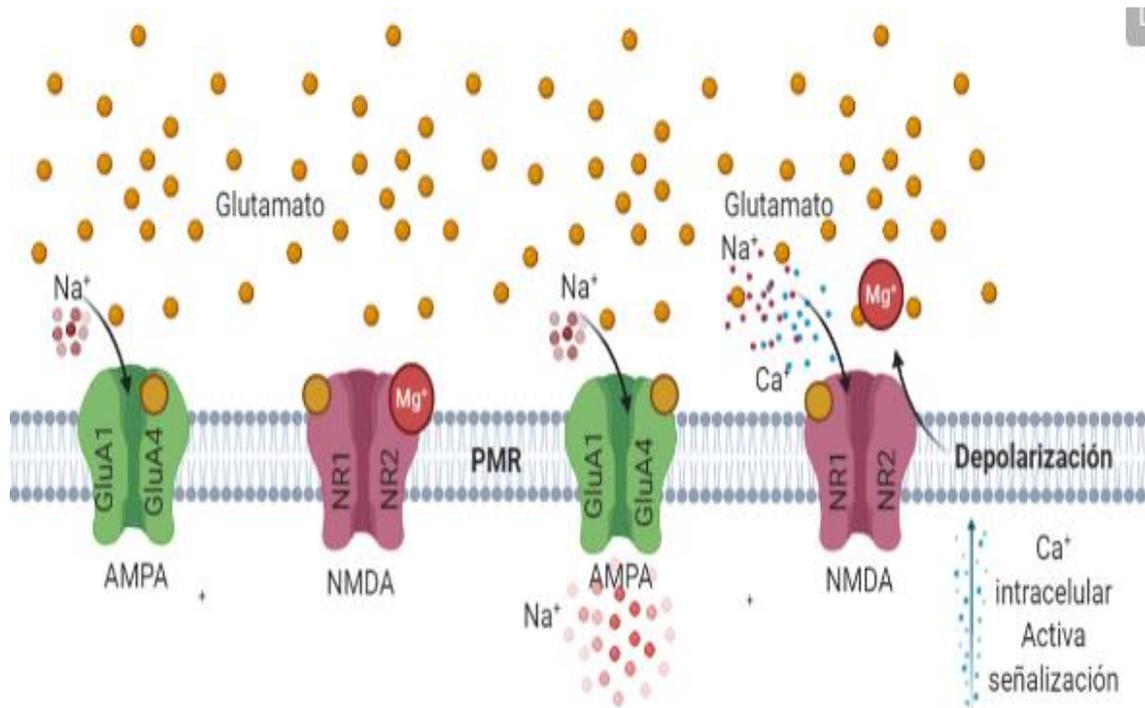


Figura 6. Activación de receptores NMDA y AMPA. NMDA muestra la activación lenta que necesita de la sincronización en la pre y post sinapsis, el bloque de Mg⁺ permanece activo hasta que llega una despolarización por la transmisión presináptica. El receptor NMDA está conformado por 3 subunidades proteicas y el receptor AMPA, conformado por 4 subunidades, que facilitan su activación al permitir el influjo de Na⁺ tras su activación a despolarización.

Una vez que esto sucede, se incrementa el Ca²⁺ en el medio intracelular activando cinasas dependientes de Ca²⁺ como la Ca²⁺/calmodulina cinasa II (CAMKII) y la proteína cinasa C (PKC) que inducen LTP (Luobon Ortega & Franco, 2010).

Estas cinasas fosforilan a los receptores AMPA aumentando su sensibilidad a glutamato activando receptores glutamatérgicos y vías de señalización que permanecían silentes hasta este momento para dar mantenimiento a la potenciación (Luobon Ortega & Franco, 2010). A frecuencias menores de estimulación se activan mecanismos similares que inducen la depresión de la fuerza sináptica.

Aunque en este caso no existe un incremento dramático de Ca^{2+} , sí existe un incremento modesto y sostenido que permite la activación de receptores NMDA (Figura 5) (Luobon Ortega & Franco, 2010).

Síntesis de proteínas y plasticidad

La duración de los procesos de plasticidad depende de los parámetros de inducción; a mayor estimulación de inducción, mayor duración de la LTP (Rudy, 2014). Los procesos que contribuyen al tiempo que se mantiene la plasticidad son de tres tipos:

1. Postraduccionales
2. Transcripcionales
3. Traduccionales

Para que estos procesos se mantengan, es necesario que se inicie la síntesis de componentes proteicos necesarios para modificar permanentemente la sinapsis. En un inicio puede inducirse y mantenerse por moléculas preexistentes, pero para sostener las nuevas conexiones sinápticas debe generarse mRNA que lleve al incremento de la síntesis de receptores AMPA en la densidad postsináptica (PSD) (Rudy, 2014). En la inducción de la LTP, encontramos un proceso llamado *tráfico constitutivo de receptores AMPA*. Este proceso se refiere a que los receptores AMPA se encuentran en movimiento para entrar a la PSD y responder de manera eficaz a la liberación de glutamato, asegurando que exista la cantidad necesaria de receptores AMPA para apoyar la transmisión y aumentar la fuerza sináptica. Para que los receptores permanezcan en un número estable, se requiere de proteínas de andamiaje (PSD-95) y de la presencia de CAMKII que fosforila la subunidad A aumentando la conductancia de estos receptores (Rudy, 2014).

Para que la LTP y la LTD puedan inducirse de manera exitosa, no basta con modular el tráfico de AMPA, también debe haber un reacomodo del citoesqueleto de actina, una red proteica que le da la arquitectura a la espina dendrítica. Para que la actina se reorganice, se necesita síntesis de proteínas como la cofilina, que regula la dinámica de la actina, o las espectrinas, que incrementan la resistencia a la despolimerización de actina (Rudy, 2014).

Después de 10-15 min de inducción, la sinapsis inicial se vuelve más resistente a cualquier tipo de interrupción, sin embargo, la estabilización de los procesos de plasticidad se vuelve inviable y altamente vulnerable a la interrupción de la potenciación o la depresión a largo plazo sin la síntesis de nuevas proteínas (Rudy, 2014).

Antibióticos y plasticidad

Existen moléculas específicas que son capaces de bloquear de forma selectiva pasos específicos de los procesos metabólicos y de crecimiento. Algunos antibióticos como la puromicina pueden inhibir la síntesis de proteínas. Su analogía estructural con el ARN terminal de transferencia, que contiene tirosina en su último nucleótido, induce un término prematuro del péptido final en la traducción de la síntesis de proteínas (Nikitin, Kozyrev, Solntseva & Nikitin, 2021). Los antibióticos pueden bloquear elementos en este y otros niveles de los procesos celulares. Procesos necesarios para la integridad celular, como la producción de energía, el metabolismo y la comunicación intracelular. La síntesis proteica es necesaria para perpetuar los cambios producidos por un estímulo. Estudios recientes demuestran que los fármacos inhibidores de la transcripción de proteínas pueden producir amnesia y falla en la reconsolidación de la memoria. Los mecanismos de consolidación suponen distintos procesos e interpretaciones para un experimento dado y la forma en la que los antibióticos pueden afectar a estos mecanismos no ha sido clara.

Sin embargo, sí es claro que los antibióticos tienen efectos sobre la consolidación y, a diferencia de otras sustancias, pueden ejercer cambios en estos procesos sin afectar al comportamiento (Nikitin, Kozyrev, Solntseva & Nikitin, 2021).

Minociclina

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos con efectos terapéuticos incluso en enfermedades no microbianas. Contienen en su estructura un núcleo hidronaftaceno unido a diversos grupos funcionales que le concederán características únicas a cada tetraciclina (García-Álvarez & Oteo, 2010). Las tetraciclinas, descubiertas en 1948 como productos de la fermentación bacteriana de *Streptomyces aureofaciens*, se han ido expandiendo en síntesis y clasificación. Ahora tenemos tetraciclinas obtenidas a partir de productos naturales, tetraciclinas químicamente modificadas, tetraciclinas semisintéticas de segunda generación y tetraciclinas de tercera generación. Dentro de la segunda generación se encuentra la minociclina (MN), una tetraciclina cuyos efectos terapéuticos han sido evaluados en muchas enfermedades no microbianas con resultados prometedores.

La MN se sintetizó en 1966, su uso fue aprobado por la FDA en 1971 y se ha empleado en la práctica clínica por más de 50 años (Möller, et al., 2016). A diferencia de otros antibióticos, el uso de MN está en aumento debido a sus propiedades farmacológicas no necesariamente asociadas a su actividad como antibiótico. La MN presenta alta afinidad a lípidos comparada con otras tetraciclinas, alta penetración en los tejidos, elevada biodisponibilidad y una vida media de eliminación prolongada (Garrido-Mesa, et al., 2013). Esas propiedades, aunadas a su naturaleza lipofílica y su tamaño pequeño, hacen que la MN sea capaz de atravesar la BH alcanzando al SNC por la proteína de transporte glucoproteína P (Milane, Fernandez, Vautier, Bensimon, Meininger & Farinotti, 2007). Además, tiene propiedades antiinflamatorias, antiapópticas e incluso hay trabajos que comparan sus efectos con el de un antagonista de receptores a glutamato (Elewa, et al., 2006).

En la clínica, la MN se prescribe en tratamientos crónicos de hasta 18 meses en administración oral; se absorbe rápidamente en el intestino y puede afectar a la flora normal microbiana (Yong Wee, et al., 2004). Ha sido útil como tratamiento para acné, conjuntivitis, shigelosis, sífilis, etc., incluso, pero poco común para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide (Hye-Sun & Yoo-Hun, 2009). El mecanismo de acción canónico responsable de su actividad bacteriostática es el bloqueo de la unión de aminoacil ARNt al sitio aceptor del ribosoma en la subunidad 30S, región esencial para la síntesis de proteínas, lo que le confiere sus propiedades bacteriostáticas. En células eucariotas, la MN también se une a ribosomas y altera la funcionalidad mitocondrial (García-Álvarez & Oteo, 2010). Los efectos que la MN pueda ejercer sobre distintos blancos son controversiales, pues no resultan letales para células eucariotas, pero sí para una variedad de bacterias. Esto sugiere que los mecanismos de acción de los efectos de la MN sobre la función mitocondrial y la síntesis proteica en células eucariotas aún no se comprenden en su totalidad (García-Álvarez & Oteo, 2010).

La dosis de MN varía dependiendo del padecimiento, el agente infeccioso, la edad del paciente y el progreso de la enfermedad. La MN puede encontrarse en presentación oral de hasta 100 mg y se prescribe por un mínimo de 4-15 días con una dosis única inicial de 200 mg y una dosis repetida de 100 mg diarios (FDA, 2005). Las dosis de MN han sido adaptadas en cantidad y vía de administración para emplearse en diferentes modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Las vías de administración más utilizadas en la investigación preclínica son la vía oral y la intraperitoneal. La vía oral ha sido administrada bajo el consumo a demanda de agua dosificada o por cánula. La mayoría de los estudios donde prueban MN utilizan dosis que van desde 10 hasta 100 mg/kg, siendo 50 mg/kg la dosis promedio (Yong Wee, et al., 2004). Es evidente que, si se hace una equivalencia directa, esta dosis es mucho mayor a la administrada en la terapéutica convencional para otros padecimientos en humanos. La razón de la administración de dosis más altas es debido al metabolismo hepático acelerado en

los roedores, ya que la vida media de la MN en roedores es de 2-3 h mientras que en humanos es de hasta 15 h (Yong Wee, et al., 2004).

Por esta razón, los efectos de MN que han sido evaluados con dosis bajas o por debajo del promedio mencionado, que son únicas o por períodos cortos, podrían no tener significancia o dar resultados inconsistentes (Yong Wee, et al., 2004).

Efectos no antibióticos

Muchos han sido los efectos no antibióticos atribuidos a la MN. Este antibiótico inhibe la liberación de mediadores proinflamatorios, pero también ha sido útil para la prevención del dolor neuropático (Padi & Kulkarni, 2008). Se ha reportado que la MN inhibe la expresión de varias enzimas, entre ellas, la proteína cinasa C (PKC), la ciclooxigenasa 2 (COX-2), p38 MAPK, el factor nuclear de transcripción NF κ B y diversas metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs 1, 2, 8, 9 y 13) (Hye-Sun & Yoo-Hun, 2009; Ryu, et al., 2004). Uno de los efectos más estudiados ha sido su potencial como agente neuroprotector. Una característica que comparten las enfermedades neurodegenerativas es la activación persistente de las células gliales, especialmente de la microglia lo que conduce a la producción constante de neurotóxicos como citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yong Wee, et al., 2004; Seabrook, et al., 2006). La MN tiene un efecto antiinflamatorio a través de la modulación de la microglia, inhibiendo la liberación de citocinas, quimiocinas y MMPs en la respuesta inflamatoria (Hye-Sun & Yoo-Hun, 2009).

La MN no solo tiene efectos sobre elementos importantes en la respuesta inflamatoria, también es capaz de modificar el potencial eléctrico de membranas intracelulares y extracelulares (Fernández-Gomez, et al., 2005). Los fármacos capaces de cambiar las concentraciones iónicas intra y extracelulares pueden tener efectos citoprotectores o citotóxicos (González, et al., 2007).

González y cols (2007) demostraron que la MN bloquea los canales de Na^+ dependientes de voltaje y reduce el número de potenciales de acción en neuronas hipocampales. También reportaron que disminuye la liberación de glutamato a través de la inhibición de la entrada de Ca^{2+} en sinaptosomas hipocampales. Los procesos de muerte celular se han relacionado con alteraciones en el potencial eléctrico de las membranas mitocondriales, así como con la elevación de Ca^{2+} citosólico y la sobre activación de receptores de glutamato (González, et al., 2007).

González y cols. (2007) evaluaron cultivos de neuronas hipocampales (80% neuronas piramidales glutamatérgicas: 20% células granulares e interneuronas GABAérgicas) tratadas con MN (10-150 μM) y expuestas a 100 μM de glutamato. Las concentraciones mayores a 75 μM de MN disminuyeron la muerte inducida por glutamato. Además, encontraron que estas concentraciones produjeron depresión en la transmisión sináptica. Fernández-Gomez y colaboradores (2005) realizaron un estudio donde extrajeron mitocondrias neuronales de ratas adultas y las expusieron a distintas concentraciones de MN (0.1-100 μM). Los autores observaron que la MN induce despolarización de la membrana y este efecto es dependiente de la concentración. Concentraciones mayores a 10 μM indujeron el colapso del potencial eléctrico transmembranal. En este estudio también se evaluó el Ca^{2+} mitocondrial. La MN redujo significativamente el Ca^{2+} intramitocondrial, y este efecto también dependió de la concentración (cambios observables arriba de 10 μM). A través de la reducción del influjo de Ca^{2+} al organelo, la MN previene su hinchamiento el cual ha sido involucrado en vías de muerte celular inducidas, por ejemplo, por NMDA (Fernández-Gomez, et al., 2005). Con estos resultados, podemos suponer que la MN no solo afecta al potencial de membrana y el flujo de Ca^{2+} sino también a la transmisión sináptica como consecuencia de éste y otros mecanismos.

En el estudio de Yau y colaboradores (2018) se evaluó un tratamiento crónico de MN con duración de 2 meses en dosis de 30 mg/kg/día en modelo de ratón KO Fmr1 (modelo para evaluación de síndrome de X frágil). Los autores demostraron que de acuerdo con el registro de las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) en registros de célula completa de giro dentado (GD), la MN incrementó la función de receptores AMPA y NMDA. Como ya se mencionó la expresión de subunidades de receptores NMDA (GluN2B y GluN2A) no es homogénea durante el desarrollo y es crítica para la formación de espinas y ramificaciones neuronales. La MN mantiene la integridad estructural en neuronas granulares del GD en los ratones KO y además tiene efecto en la expresión de estas subunidades tanto en los WT como en los KO.

Algunos años antes, Bilousova y colaboradores (2014) demostraron que hay formación de espinas dendríticas maduras en cultivos de neuronas hipocampales tratadas con 20 μ M de MN por 17 h. En este estudio también se utilizó el modelo de ratón KO Fmr1 (gen que codifica para la proteína FMRP, cuya ausencia ha sido relacionada con el desarrollo de déficit cognitivo) y se administraron 30 mg/kg/día de MN por 21 días a ratones de 3 semanas de edad. Se observó que la MN corrige las aberraciones estructurales inducidas por la delección de la proteína en el hipocampo de estos ratones.

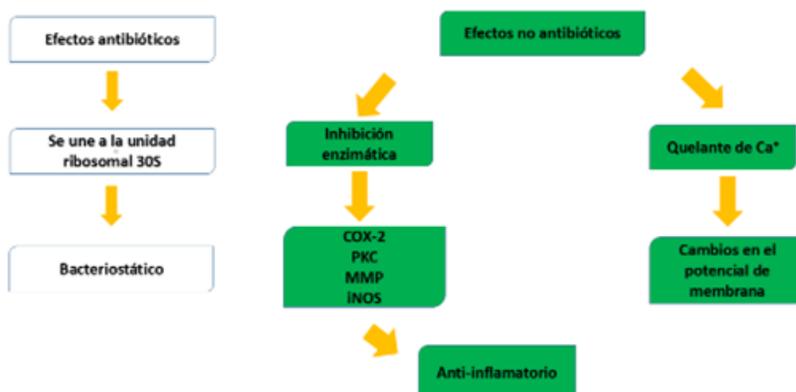


Figura 7. Efectos antibióticos y no antibióticos generales de la MN.

Además, la MN reduce la sobreexpresión de la MMP-9 en cultivo hipocampal, una metaloproteinasa cuya función interfiere en la morfología neuronal, así como en la función sináptica y plasticidad en el hipocampo adulto a través de mecanismos celulares dependientes de integrinas. Las integrinas modulan las corrientes sinápticas mediadas por los receptores NMDA que son fundamentales para los procesos de plasticidad como la potenciación o depresión a largo plazo, es decir, la LTP y LTD respectivamente (Bilousova, et al., 2014). A modo de síntesis, la figura 7 muestra los efectos generales antibióticos y no antibióticos de la MN.

Los resultados que se han obtenido hasta ahora sugieren que la MN puede modificar el flujo de información neuronal en la formación hipocampal y que existe una modulación de la transmisión glutamatérgica y de la síntesis de proteínas, elementos críticos para el establecimiento de procesos de plasticidad (Rudy, 2014). Sin embargo, no hay estudios que se enfoquen directamente y de forma sistemática en el estudio de la LTP y la LTD.

Mecanismo de acción

Muchos de los efectos no antibióticos de la MN han sido explicados por su efecto sobre la inhibición de la activación de vías de señalización inflamatorias. La MN reduce la actividad de elementos proinflamatorios por la inhibición de la activación de la vía del $\text{NF}\kappa\text{B}$, esta activación ha sido relacionada con procesos neurodegenerativos (Santa-Cecilia, et al., 2016; Nikodemova, et al., 2006). El $\text{NF}\kappa\text{B}$ es una formación de dímeros de unión al ADN, conformado por subunidades proteicas homologas de genes diana κB . Estas proteínas poseen un motivo de unión al ADN en un dominio homólogo de dimerización altamente conservado (RHD) encontrado en la porción N-terminal de la cadena polipeptídica (Biancalana, Natan, Lenardo & Fersht, 2006).

En este grupo, encontramos algunas proteínas como la clásica y ubicua p50, que junto con la p65/RelA, actúan como mediadores inflamatorios primarios. La cRel o proteína Rel que es de origen hematopoyético y finalmente los polipéptidos p52 y RelB que forman heterodímeros que responden a estímulos no inflamatorios (Hoffmann & Baltimore, 2006).

Estas subunidades forman un complejo dinámico que se expresa de forma distinta a lo largo de la maduración del cerebro. En cerebros inmaduros se induce la expresión del NFκB compuesto por homodímeros de la p50 y heterodímeros de p65/cRel, combinaciones que no se encuentran en ratas adultas, por ejemplo (figura 8) (Mattson, 2005).

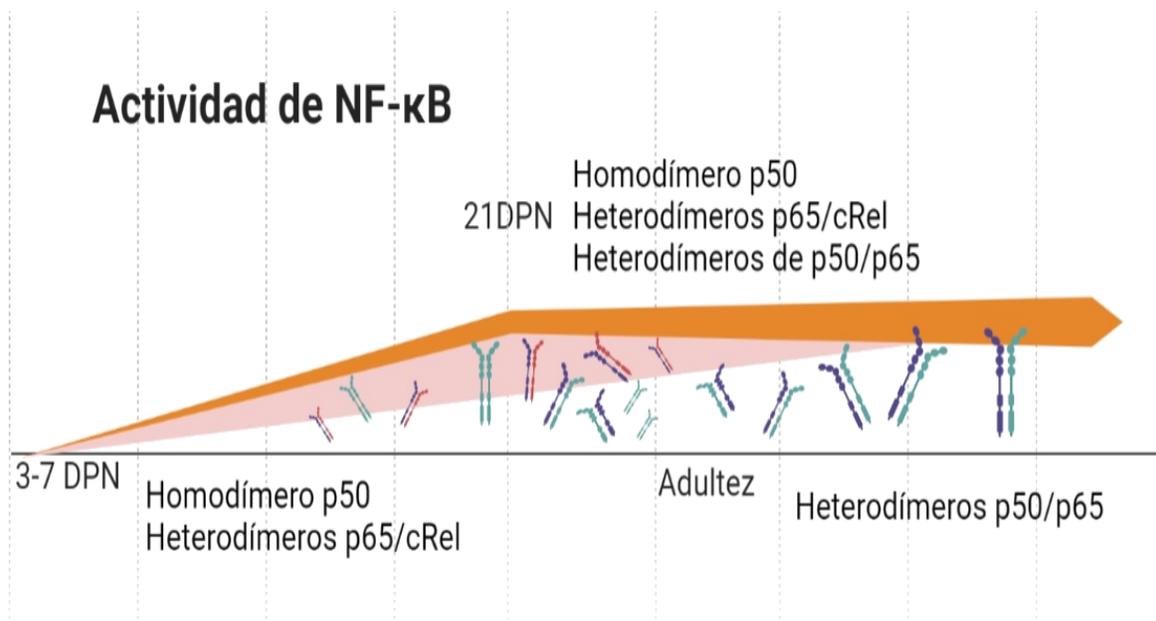


Figura 8. Actividad basal de NFκB. La actividad del complejo comienza desde los primeros días después del nacimiento y va en aumento hasta los 21 DPN donde se estabiliza hasta la adultez. En la adultez, NFκB está activo constitutivamente en las neuronas en mayor medida que en otros tipos celulares, en esta imagen se muestra la conformación neuronal de dimeros característica de cada etapa, Mattson, 2005.

La ausencia de la p50 ha sido asociada con la disminución de la magnitud de la LTP y también con insensibilidad a la inducción de la LTD. La activación de esta vía también se ha visto en respuesta a la inducción de estos dos fenómenos.

La actividad de NF κ B está regulada por el acoplamiento de una subunidad inhibitoria (I κ B). Para que esta subunidad sea desplazada se requiere una cinasa de I κ B (IKK) que a su vez está conformada por dos subunidades catalíticas (IKK α y IKK β) y una subunidad inhibitoria (IKK ψ). Esta cinasa puede activarse por la proteína activada a mitógeno (MAP), por la proteína cinasa C (PKC) o por el complejo calcio-calmodulina dependiente de cinasa. El NF κ B se encarga de regular la expresión de una gran variedad de genes, entre ellos los que codifican para proteínas encargadas de la homeóstasis iónica. La activación del NF κ B modula la homeostasis iónica a través de la regulación de genes que codifican para proteínas presentes en las subunidades de los receptores NMDA y proteínas que forman los canales de Ca⁺ dependientes de voltaje (Mattson, 2005). El factor de transcripción también está involucrado en la expresión de genes asociados al neurodesarrollo, proceso que demanda diversas formas de plasticidad. La expresión de NF κ B regula la señalización de la activación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de ligandos tipo Notch, proteínas necesarias para la maduración neuronal (Plane, et al., 2010).

2. Planteamiento del problema

La MN es un antibiótico que previene daño neuronal asociado a diversas patologías. Hay evidencias de que la MN inhibe la activación del complejo NFκB cuya actividad se ha relacionado con procesos de plasticidad. La MN tiene efectos sobre la transmisión glutamatérgica a través de la modulación de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y específicamente tiene efecto sobre las subunidades del receptor de glutamato NMDA. Sin embargo, no se conoce el efecto *per se* de este fármaco sobre la transmisión sináptica y los procesos de plasticidad hipocampal dependientes de receptores NMDA. Este proyecto determinará si un tratamiento subcrónico con MN, que mimetice dosis y tiempos de administración con relevancia clínica, modifica la integridad de las sinapsis de las colaterales de Schaffer en el hipocampo.

3. Hipótesis

Con base en los antecedentes de la literatura, planteamos las siguientes hipótesis, el tratamiento subcrónico con disminuirá:

- A. La excitabilidad de las neuronas piramidales del hipocampo.
- B. La fuerza de la transmisión glutamatérgica del hipocampo.
- C. La magnitud de la potenciación a largo plazo en el hipocampo.
- D. La magnitud de la depresión a largo plazo en el hipocampo.

4. Objetivos

Objetivo general

Determinar si el tratamiento subcrónico con MN produce alteraciones electrofisiológicas en la transmisión glutamatérgica tipo NMDA de la sinapsis Colaterales de Schaffer – neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.

Objetivos específicos

En rebanadas de hipocampo de ratas SD sometidas a un tratamiento subcrónico de minociclina:

1. Evaluar la fuerza de la excitabilidad neuronal y la fuerza de transmisión sináptica en la sinapsis de las Colaterales de Schaffer – CA1 del hipocampo.
2. Evaluar la magnitud de la LTP y la LTD inducida por estimulación de alta y baja frecuencia respectivamente, en las Colaterales de Schaffer – CA1 del hipocampo.

5. Materiales y métodos

Declaración ética

Todos los experimentos presentados en este trabajo se realizaron siguiendo el protocolo de manipulación aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del CINVESTAV (CICUAL No. 0090-14) bajo la norma mexicana NOM-062-ZOO 1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

Animales

Se usaron ratas adolescentes macho de la cepa Sprague Dawley de 21 días post natales, cuando el circuito hipocampal se encuentra en un período vulnerable y tienen un peso aproximado de 60-90 g. Los animales se mantuvieron agrupados en cajas estándar dentro de un cuarto con condiciones ambientales controladas; a una temperatura de 22-24°C con agua y alimento *ad libitum*.

Tratamiento subcrónico con minociclina

Las ratas se sometieron a un tratamiento con duración de 14 días donde se les administró diariamente en el mismo horario (10:00 -11:00 am) una dosis de 50 mg/kg MN (Sigma-Aldrich, Toluca, Estado de México) de una solución de 5 mg/ml para administrar no más de 1 mL por 100 g de peso. Esta administración fue vía oral con el uso de una cánula gástrica. Los animales control, recibieron solución Salina en lugar de MN. Una vez pasado este tiempo se iniciaron los protocolos para las evaluaciones electrofisiológicas.

Obtención de cortes de hipocampo

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg) para ser sacrificarlas por decapitación y extraer el cerebro. Éste se trasladó de forma inmediata a una solución de sacarosa de la siguiente composición (nM): 210 sacarosa, 2.8 KCl, 2.0 MgSO₄, 1.25 Na₂HPO₄, 26 NaHCO₂, 10 glucosa, 1 MgCl₂ y 1 CaCl₂. Con ayuda del equipo de disección se separaron los hemisferios y se retiró el cerebelo y los bulbos olfatorios. Las secciones útiles se fijaron con pegamento a un vibratomo para obtener rebanadas transversales de hipocampo de 385 μ m de grosor mientras éste estuvo sumergido en la solución de sacarosa con flujo constante (95% O₂: 5% CO₂). Las rebanadas se colocaron en una solución de incubación que imitó las condiciones fisiológicas del líquido cefalorraquídeo (LCR), la cual contuvo (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na₂HPO₄,

25 NaHCOO₂, 4 MgCl₂, 10 glucosa y 1 CaCl₂, esto se hizo por 20 min a 37°C. Pasado este tiempo, las rebanadas se incubaron durante 1 h con carbógeno (95% O₂: 5% CO₂).

Registros electrofisiológicos de campo

Para comenzar el registro, la rebanada se transfirió a una cámara de registro con LCR artificial que contuvo (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 Na₂HPO₄, 25 NaHCOO₂, 2 MgCl₂, 10 glucosa y 2 CaCl₂ con gaseo constante de carbógeno a 33°C. La rebanada se posicionó en la cámara para que quedara fija y se colocaron los electrodos de estímulo y de registro según la vía a evaluar. Para este experimento el electrodo de estímulo se colocó en CA3 en el ER o en EO y el electrodo de registro se coloca en la proyección de estas fibras en CA1 en el EP.

El electrodo de registro se llenó con una solución mM de NaCl con una resistencia de 1 y 4 MΩ. El electrodo de estimulación estuvo conectado a una batería que suministró intensidades variables de corriente. A través de esta estimulación se obtuvieron los registros de potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP) a los cuales se le hizo el análisis de sus componentes: pendiente y amplitud del EPSP y la amplitud de espigas poblacionales utilizando los softwares LabView 7.1 y Matlab R2012b.

Para conocer la respuesta neuronal de las rebanadas, se realizaron curvas input/output (entrada/salida I/O) y para conocer la potenciación y depresión de procesos de plasticidad a largo plazo se realizaron los protocolos de LTP y LTD como se detalla más adelante.

Protocolos de registro electrofisiológico

Curva de entrada y salida

Este protocolo se realizó para establecer el nivel de respuestas postsinápticas de las fibras axónicas. Una vez colocados los electrodos de estimulación y registro en la posición correspondiente, se hizo una estimulación por pulso pareado; es decir, se aplicó un primer pulso seguido de un segundo pulso con un intervalo de 60 ms entre estos a intensidades de corriente crecientes, comenzando por porcentajes pequeños de corriente (10%-100% de 1 mA).

Una vez que se obtuvo un EPSP que respondió (cambió su amplitud) a distintas intensidades de estimulación, se partió de un 0% de estimulación y se incrementó la intensidad del estímulo en intervalos de corriente para conocer el nivel de saturación de la respuesta. Este protocolo se realizó tanto en animales control como en animales tratados para determinar la fuerza de transmisión sináptica en la región CA1.

Inducción de potenciación a largo plazo dependiente de GluR

Una vez conocido el porcentaje al cual la respuesta se saturó sin presencia de espigas poblacionales y sin dejar de facilitarse en el pulso pareado, se definió el EPSP máximo y se definió la intensidad de la corriente equivalente a $1/3 - 2/3$ de la respuesta máxima. Esta respuesta se mantuvo estable por al menos 15 min y se aplicó un protocolo de estimulación de alta frecuencia (HFS). La HFS constó de 2 trenes de estimulación seguidos uno de otro cada 10seg a 100Hz con duración de 1 s cada uno. Este protocolo es ampliamente utilizado para inducir LTP por varias horas y en este proyecto se utilizó para identificar las posibles alteraciones en la inducción y expresión de LTP en CA1 tras la administración repetida de MN.

Inducción de depresión a largo plazo dependiente de GluR

De manera similar, se encontró una respuesta correspondiente al 50 – 70 % de la respuesta máxima evocada siendo estable por al menos 15 min y se aplicó un protocolo de estimulación a baja frecuencia (LFS). La LFS constó de pulsos a 1Hz durante 15min, la estimulación prolongada (5-30min) a baja frecuencia puede evocar LTD (Lüscher & Malenka, 2012). Con este protocolo se determinaron las posibles alteraciones en la inducción y expresión de la LTD en CA1 tras la administración repetida de MN.

Análisis estadístico

Todos los datos en las gráficas se muestran con el promedio de la media y el error estándar (ee). A todos los datos obtenidos y agrupados se les hizo una prueba de normalidad. Para la comparación estadística de las curvas I/O se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores, donde el factor 1 fue la intensidad de corriente y el factor 2 el tratamiento, después se hizo la prueba de Sidak como prueba post hoc. La amplitud máxima obtenida en ambas curvas I-O se compara con una prueba T de Student respecto a su grupo control. Para la comparación de las respuestas obtenidas una vez aplicados los protocolos de plasticidad, se utilizó el porcentaje de la pendiente del EPSP y se comparó con el porcentaje de la pendiente del grupo control en los últimos 10min de las respuestas expresadas durante 90min utilizando una prueba T de student. La significancia estadística de los análisis se estableció con un valor de $p \leq 0.05$.

6. Resultados

El grupo de ratas macho SD tratado con MN (n=7) no presentó cambios físicos (aumento o disminución de peso, pigmentación en el pelaje o en los dientes) o cambios conductuales (hiperactividad o irritabilidad durante o después de la manipulación para la administración) en comparación con el grupo al que solo se le administró el vehículo (agua potable n=5). Una vez que concluyó el período de administración, las ratas fueron sacrificadas al menos 1 día después de la última administración o en los días subsecuentes sin dejar pasar más de 3 días desde la última administración.

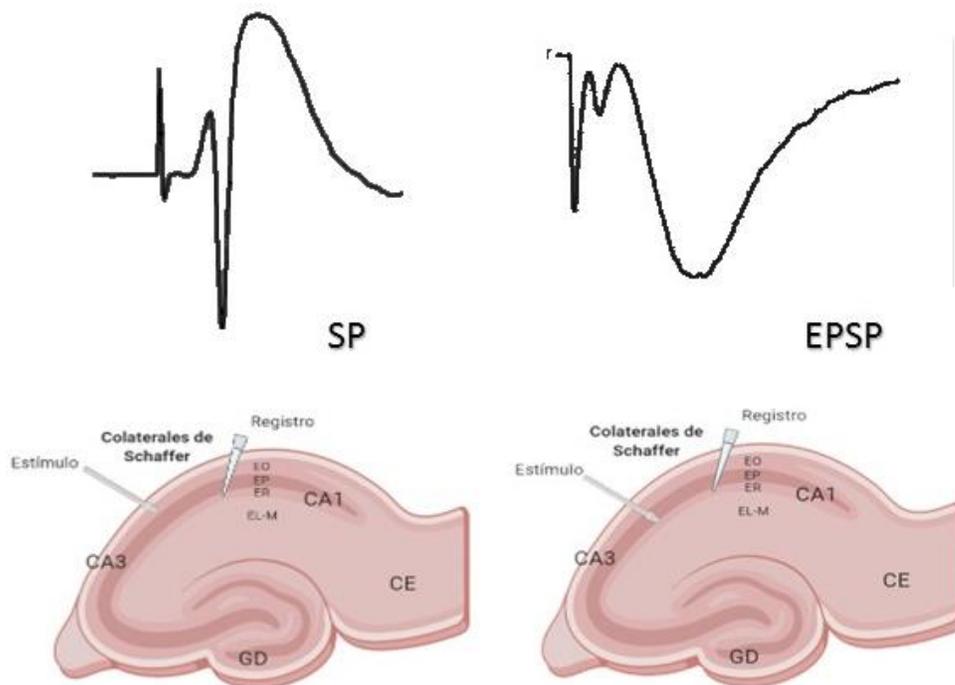


Figura 9. Posicionamiento de los electrodos para el registro electrofisiológico. Electrodo y ejemplo de señal evocada para el registro de espigas poblacionales (SP, izquierda) y de potenciales post sinápticos excitatorios (EPSP, derecha).

Los registros extracelulares fueron de 22 rebanadas obtenidas de cerebros frescos (grupo control + grupo MN) extraídos una vez que terminó el tratamiento, alrededor de los 40 ± 2 DPN. En todas las rebanadas seleccionadas se distinguió con claridad la distribución laminar del hipocampo. Para el registro de las espigas poblacionales se utilizaron rebanadas ventrales y dorsales, mientras que para los experimentos de plasticidad sináptica se seleccionaron rebanadas de hipocampo dorsal. Esto debido a que la plasticidad sináptica de la región dorsal del hipocampo está involucrada en el procesamiento cognitivo ((Hawkins, Gavin & Sweatt, 2016). El electrodo de estimulación se colocó en dos regiones: en el estrato oriens para evocar estimulación ortodrómica de espigas poblacionales (Figura 9, panel izquierdo) y en el estrato radiatum, para el registro de los potenciales postsinápticos excitadores (Figura 9, panel derecho). La pipeta de registro se posicionó en el EP o en ER proximal en la misma región y en sentido ortodrómico, región que corresponde a la sinapsis de las Colaterales de Schaffer (figura 9).

Los experimentos incluidos en este trabajo fueron aquellos donde la respuesta evocada cumplió con las características cinéticas tanto de las espigas poblacionales ((Andersen, Bliss & Skvede, 1971) como de los EPSPs(Schwartzkroin, 1975) . Las espigas poblacionales son respuestas rápidas (2 - 5 ms) mediadas por la entrada de sodio y salida de potasio a través de canales de sodio y potasio sensibles a voltaje. Presentan latencia reducida (>2 ms), además de tener pendientes de caída / subida rápidas (Figura 9, panel izquierdo). Al ser un potencial de acción, la espiga poblacional desaparece al sustituir el sodio del medio extracelular con N-Metil-D-glucamina (NMDG 150 mM). Por otra parte, los EPSP son respuestas más lentas, con una latencia entre 5-10 ms y pendientes de caída y subida relativamente lentas (Figura 9, panel derecho). Al igual que las espigas poblacionales, los EPSPs tienen amplitud variable. Al estar mediados por la activación de receptores NMDA y AMPA, los EPSPs se

deprimen en presencia del antagonista no selectivo de receptores ionotrópicos de glutamato, ácido kinurénico (AK 500 μ M,)(Sayer, Friedlander & Redman, 1990).

La minociclina modifica la excitabilidad y la fuerza de transmisión en las Colaterales de Schaffer – CA1 en hipocampo de ratas

En primera instancia se evaluó la excitabilidad neuronal y la fuerza de la transmisión sináptica mediante la amplitud de las espigas poblacionales y los EPSPs, respectivamente. Dichas evaluaciones se realizaron mediante curvas de inyección de corriente vs respuesta neuronal (curva I – O).

Espigas poblacionales

Tras la obtención de una respuesta estable, se aplicaron pulsos cuadrados de corriente (100 μ s de duración, con incrementos de 10 μ A hasta llegar a 100 μ A) con una frecuencia de 0.016 Hz. Para cada pulso de corriente, se promediaron 4 respuestas celulares consecutivas. En comparación con la curva I – O en condición control, la curva del grupo MN presentó una disminución en la amplitud de las espigas poblacionales (amplitud máxima en grupo control = 8.55 ± 0.8 mV; Amplitud máxima en el grupo MN = 5.53 ± 0.5 mV; n = 4 rebanadas / 4 ratas por grupo; T de student no pareada para comparar las amplitudes máximas obtenidas en el grupo control vs el grupo MN **p= 0.0037; ANOVA de dos factores para comparar todas las amplitudes obtenidas de ambos grupos, factor 1 = intensidad de estimulación, factor 2 = tratamiento interacción $F_{1,6} = 8.79$ *p=0.025; figura 10).

Potenciales postsinápticos excitadores

De manera similar, la curva I – O de los EPSPs mostró una disminución en la amplitud en presencia de MN (amplitud máxima del EPSP en condición control = 6.4 ± 0.7 mV. Amplitud máxima en el grupo administrado con MN = 3.57 ± 0.4 mV; n = 5 rebanadas / 5 ratas por grupo; T de student no pareada para comparar las amplitudes máximas obtenidas en el grupo control vs el grupo MN **p=0.0038;

ANOVA de dos factores para comparar todas las amplitudes obtenidas de ambos grupos factor 1: intensidad de estimulación, factor 2: tratamiento administrado interacción $F_{1,8} = 14.7$ $**p = 0.005$, figura 11).

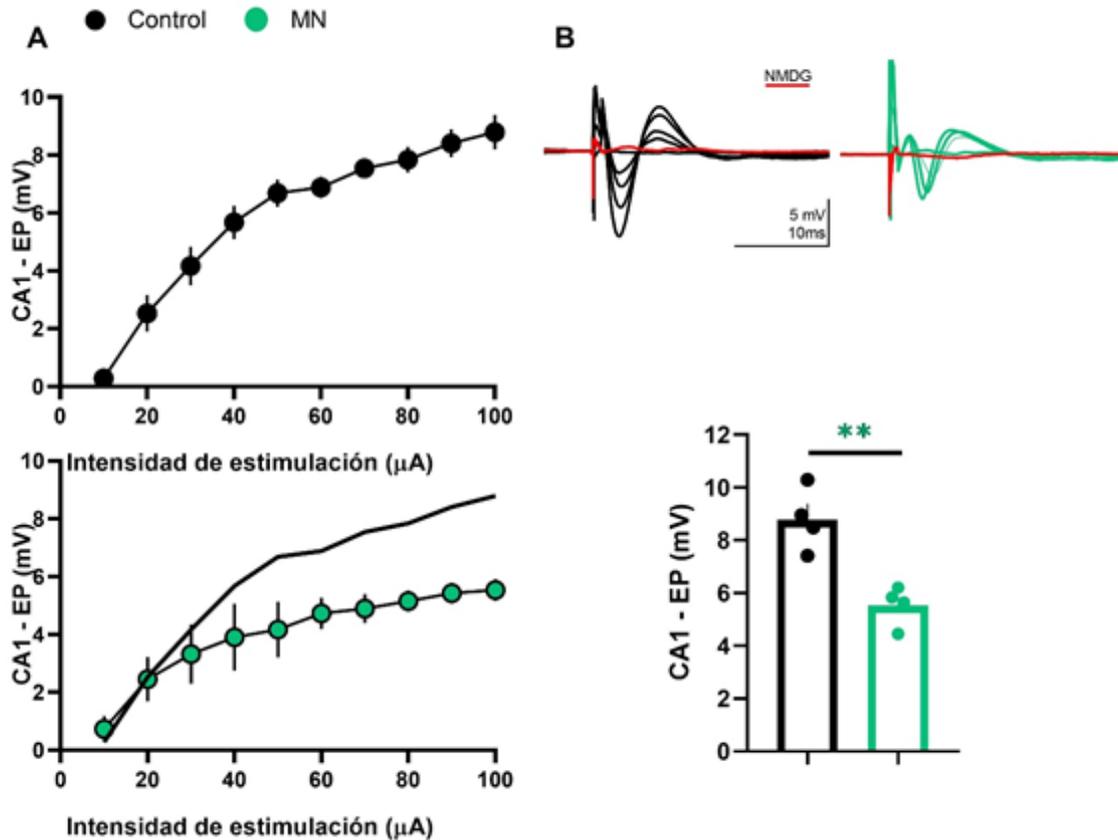


Figura 10. La minociclina disminuye la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1. A Panel superior Curva I-O de EP Amplitud máxima control = 8.55 ± 0.87 mV; $n = 4$ rebanadas / 4 ratas. **Panel inferior** Curva I/O de EP Amplitud máxima MN = 5.53 ± 0.48 mV; $n = 4$ rebanadas / 4 ratas **B Panel superior:** Trazos representativos de las espigas poblacionales de las curvas I-O, en negro grupo control, en verde tratamiento con MN, en rojo el trazo al final de la perfusión a las rebanadas con NMDG. **B Panel inferior** media \pm error estándar de la respuesta máxima obtenida de las curvas IO amplitud máxima control = 8.55 ± 0.87 mV; MN = 5.53 ± 0.48 mV. T de student para datos no pareados $**p = 0.0037$.

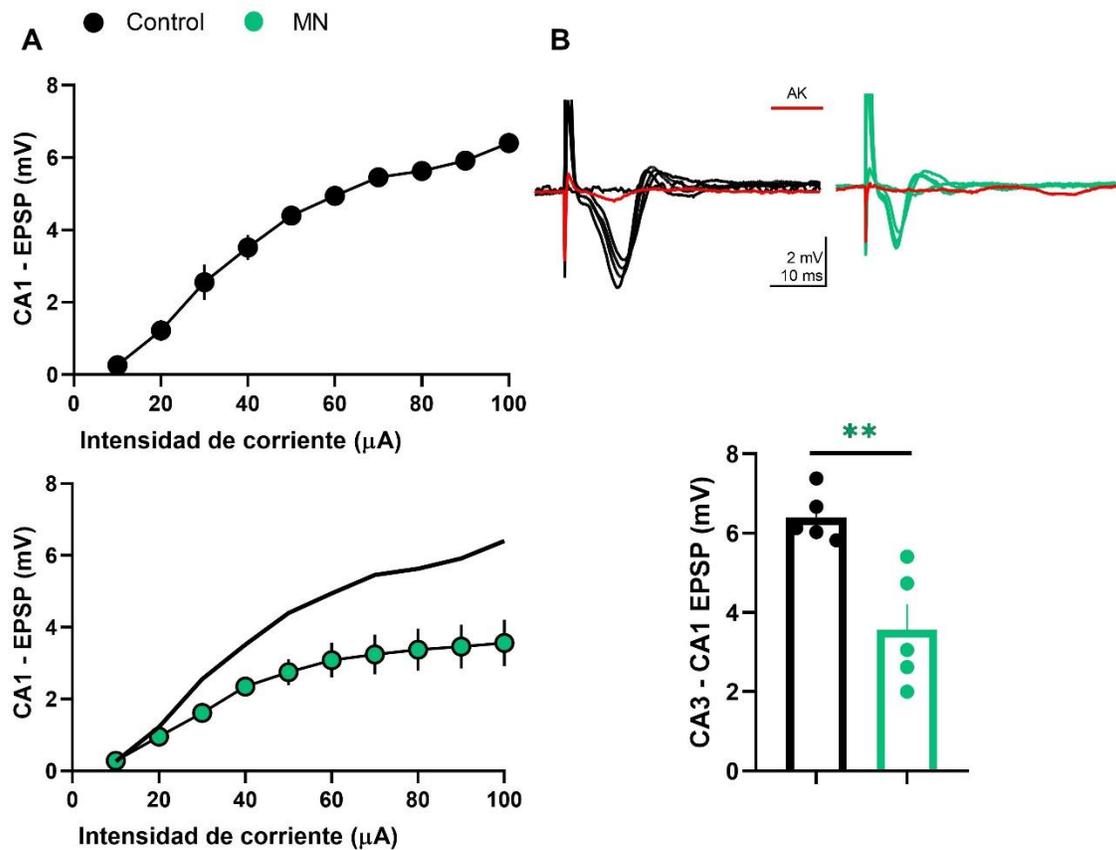


Figura 11. La minociclina disminuye la fuerza de transmisión sináptica de las Colaterales de Schaffer - CA1. A Panel superior Curva I-O de EPSP en Amplitud máxima control = 6.41 ± 0.66 mV; n= 4 rebanadas / 4 ratas. **A Panel inferior** Curva I/O de EP Amplitud máxima MN = 3.57 ± 0.36 mV; n= 5 rebanadas / 5 ratas **B Panel superior:** Trazos representativos de los EPSP de las curvas I-O, en negro grupo control, en verde tratamiento con MN, en rojo el trazo al final de la perfusión de las rebanadas con AK. **B Panel inferior** media \pm error estándar de la respuesta máxima obtenida de la curva amplitud máxima control = 6.41 ± 0.66 mV; MN = 3.57 ± 0.36 mV. T de student para datos no pareados ** p=0.005.

La minociclina disminuye la magnitud de la potenciación a largo plazo (LTP) en la sinapsis colaterales de Schaffer – CA1.

Dadas las alteraciones en la fuerza de la transmisión sináptica (Figura 11), el siguiente paso fue evaluar el efecto de la MN sobre la inducción y expresión de LTP. Una vez que se encontró un EPSP estable (sin cambios en la amplitud), se registró una basal de respuestas sinápticas durante 15 minutos. Tras este periodo, se aplicó estimulación de alta frecuencia (HFS) a las colaterales de Schaffer (100 pulsos de corriente a 100 Hz, repetido dos veces con un intervalo de 10 segundos) y se continuó el registro de EPSPs por 90 min. Una vez terminado ese tiempo se perfundió AK, los trazos representativos de estos momentos se observan en la figura 12B panel superior.

La HFS indujo una potenciación post - tetánica (PTP), seguido de un incremento sostenido de la pendiente del EPSP que se mantuvo durante todo el experimento (Figura 12A panel superior curso temporal grupo control, panel inferior curso temporal del grupo administrado con MN). En condición control la PTP fue mayor que la observada en el grupo MN (PTP en condición control = $262.8 \pm 2.62\%$ con respecto a la basal. PTP en grupo MN = $148.6 \pm 27.80\%$ con respecto a basal; T de student para datos no pareados $*p= 0.0149$, figura 12 B panel inferior) De igual manera, la magnitud de LTP inducida en condición control fue superior a la obtenida en rebanadas tratadas con MN (LTP a los 90 min post HFS en control = $175.8 \pm 21.58\%$ con respecto a la basal. En rebanadas tratadas con MN = $123 \pm 2.51\%$ con respecto a la basal; T de student datos no pareados $*p=0.179$, Figura 12 B panel inferior).

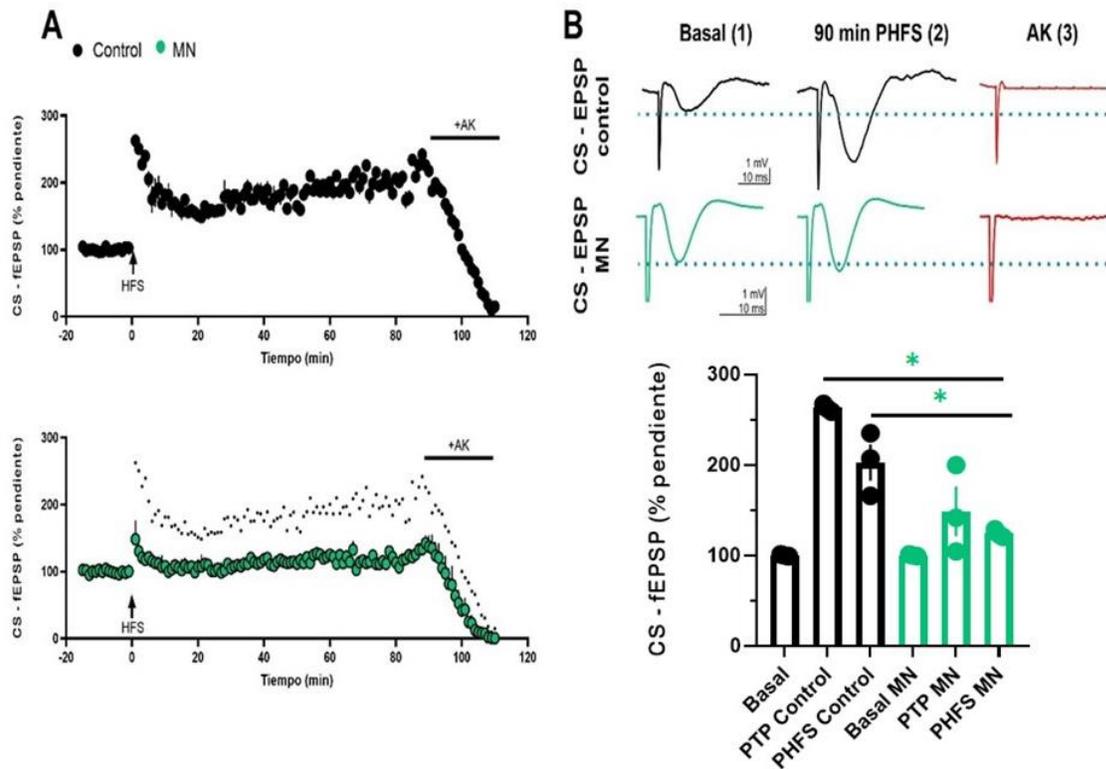


Figura 12. La minociclina disminuye la magnitud de la potenciación a largo plazo en las Colaterales de Schaffer - CA1. Curso temporal de LTP **A Panel superior** control aumento del porcentaje %pendiente del EPSP = $175.8 \pm 21.58\%$; $n = 3$ rebanadas / 3 ratas. **A Panel superior** MN aumento del %pendiente del EPSP = $123 \pm 2.51\%$; $n = 3$ rebanadas / 3 ratas **B Panel superior:** Trazos representativos de los EPSPs a través del curso temporal, en negro grupo control, en verde tratamiento con MN, en rojo el trazo al final de la perfusión con AK. **B Panel inferior** media \pm error estándar de la respuesta 90 min post-HFS control: $175.8 \pm 21.58\%$ vs 90 min post-HFS MN = $123 \pm 2.51\%$ T de student datos no pareados $*p = 0.0352$; PTP control = $262.8 \pm 2.62\%$ vs PTP MN = $148.6 \pm 27.80\%$ T de student para datos no pareados $*p = 0.0149$.

La minociclina altera la inducción de depresión a largo plazo (LTD) en la sinapsis colaterales de Schaffer – CA1

La depresión sináptica en la región CA1 del hipocampo, es un proceso mediado por la activación de receptores NMDA (Lüscher & Malenka, 2012). Como nuestros resultados muestran alteraciones en la transmisión sináptica NMDA, el siguiente experimento exploró posibles alteraciones en la inducción de LTD. Se obtuvo una basal de EPSPs por 15 min. Tras este periodo, se aplicó estimulación de baja frecuencia (900 pulsos de estimulación a 1 Hz; duración total: 15 min) y el registro continuó por 90 min, al final se perfundió AK. La LFS indujo una depresión seguido de un decremento sostenido de la pendiente del EPSP y esta se mantuvo durante todo el experimento (cursos temporales de LTD grupo control y grupo MN figura 13 Panel A superior y medio y sus trazos representativos: figura 13 panel B superior y medio). Tanto en condición control como con MN se observó un decremento de la respuesta sin diferencias significativas (LTD a los 90min post LFS en grupo control= $46.76 \pm 4.707\%$, en grupo MN= $36.66 \pm 11\%$ respecto a la basal, T de student no pareada $p=0.0253$). Sin embargo, parte del grupo administrado con MN mostró un comportamiento distinto a estos resultados (curso temporal figura 13 panel A inferior y su trazo representativo; figura 13 panel B inferior). Una vez aplicada la LFS, este grupo mostró una depresión menor de la pendiente del EPSP en comparación con el grupo control y este decremento solo se mantuvo los primeros 15 min (LTD a los 15 min post LFS en condición control = $35.57 \pm 11.01\%$, grupo tratado con MN= $74.83 \pm 4.9\%$, T de student datos no pareados $**p=0.0021$, figura 13 panel C). Seguido a este evento se observó un incremento en la pendiente que se mantuvo hasta terminado el experimento (LTD a los 90 min post LFS en condición control = $46.76 \pm 4.707\%$, grupo MN $129.5 \pm 8\%$, T de student para datos no pareados $***p=0.0009$, figura 13 panel C).

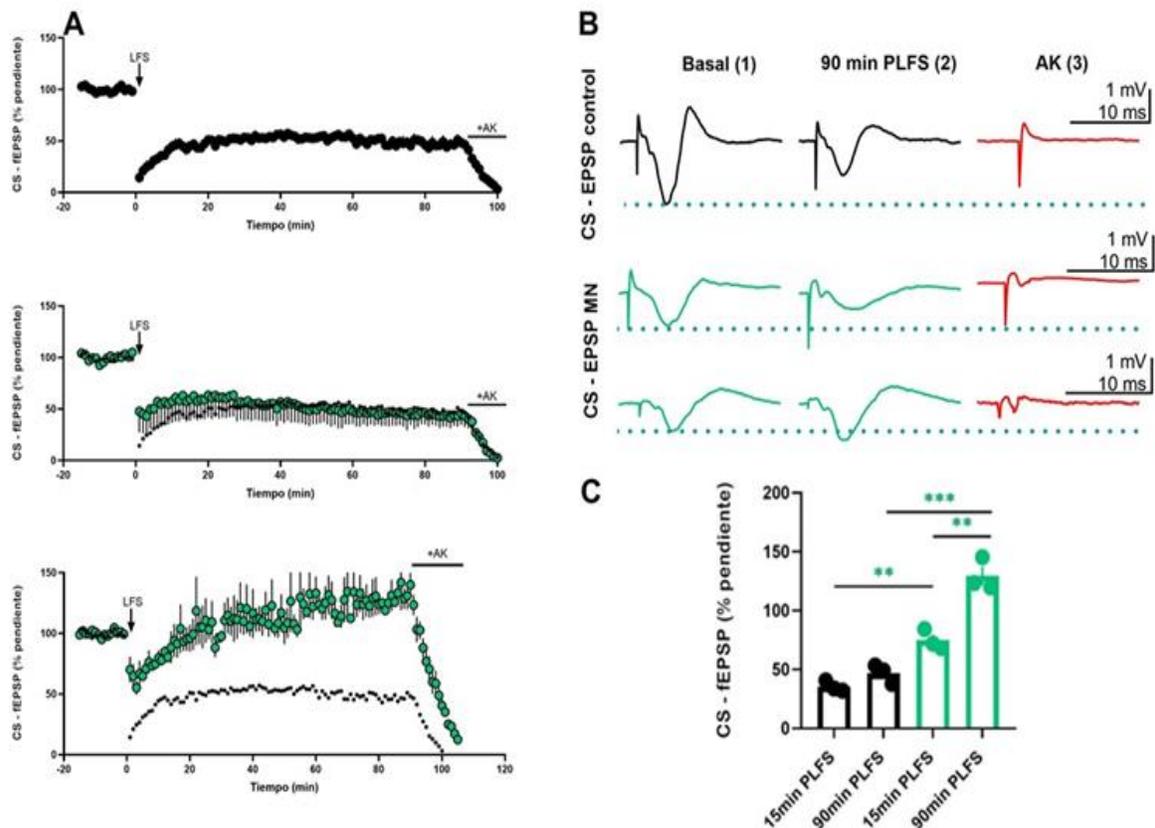


Figura 13. La minociclina produce alteraciones en la inducción de la depresión a largo plazo en las Colaterales de Schaffer - CA1. Curso temporal de LTD **A Panel superior** control %pendiente del EPSP PLFS = $46.76 \pm 4.707\%$; n = 3 rebanadas / 3 ratas. **A Panel medio** MN %pendiente del EPSP PLFS = $36.66 \pm 11.01\%$; n = 3 rebanadas / 3 ratas **A Panel inferior** MN comportamiento bifásico, %pendiente del EPSP PLFS = $129.5 \pm 8\%$; n = 3 rebanadas / 3 ratas **B Panel superior** trazos representativos de los EPSPs, en negro control, en verde MN, comportamiento normal (B superior) y bifásico (B inferior), en rojo el trazo al final de la perfusión de AK. **C Panel izquierdo** media \pm error estándar de basal control vs 90 min post-LFS control *p=0.01 T de student (color negro), y basal MN vs. 90 post-LFS MN *p= 0.0253 (color verde). **C Panel derecho** media \pm error estándar control 15 min post-LFS = $35.57 \pm 11.01\%$ vs MN 15 min post-LFS = $74.83 \pm 4.9\%$ T de student datos no pareados **p=0.0021; 90 min post-LFS control = $46.76 \pm 4.707\%$ vs 90min post-LFS MN= $129.5 \pm 8\%$ T de student datos no pareados ***p=0.0009; 15 min post-LFS MN vs 90 min post-LFS MN t de student **p=0.0179.

7. Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que un tratamiento subcrónico (14 días) y oral (50 mg/kg/día) de MN disminuye la excitabilidad neuronal (evaluada con espigas poblacionales) y la fuerza de la transmisión sináptica (evaluada con EPSPs) en la región CA1 del hipocampo. Las alteraciones causadas por MN comprometen la integridad de la comunicación neuronal mediada por potenciales de acción y por receptores NMDA. Además, estas alteraciones se reflejaron en las fallas en la inducción y mantenimiento de LTP y LTD, procesos dependientes de receptores NMDA.

Alteraciones en la excitabilidad y la fuerza de transmisión sináptica producidas por la MN

El tratamiento con MN causa una disminución de la amplitud de las espigas poblacionales. Una disminución en la amplitud de la espiga poblacional refleja alteración en la funcionalidad de los canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje o daño en las fibras aferentes. Estudios previos mostraron que la MN bloquea a los canales de Na⁺ dependientes de voltaje (González, Egea, del Carmen Godino, Fernandez-Gomez, Sánchez-Prieto, Gandía, García, Jordán & Hernández-Guijo, 2007), fenómeno que afecta directamente la generación y propagación del potencial de acción. En el mismo estudio, los autores reportaron que la perfusión de MN disminuye la frecuencia de disparo y un incremento en la fase de hiperpolarización y el aumento en la velocidad de la caída del potencial, dato que sugiere modulación de canales de K⁺ que participan en el disparo neuronal, fenómeno que a la fecha requiere investigación adicional.

En el mismo sentido, la MN altera el equilibrio de las corrientes iónicas por ser un quelante de cationes divalentes (Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺). El secuestro de estos iones,

especialmente del Ca^{2+} en el medio intra y extracelular no solo afectaría la señalización celular dependiente de este ion, sino también afectaría la cinética de otras corrientes, incluidas las de K^+ dependientes de Ca^{2+} (I_{KCa}). La alteración en la cinética de esta corriente explicaría los cambios en la frecuencia de disparo y en la fase de repolarización tras la generación de una espiga (el Dum, Fourcaud-Trocm, Garcia & Kuczewski, 2015; González, Egea, del Carmen Godino, Fernandez-Gomez, Sánchez-Prieto, Gandía, García, Jordán & Hernández-Guijo, 2007).

Las curvas I - O obtenidas de los EPSP también evidenciaron el efecto depresor de la MN sobre la respuesta sináptica. Como ya se mencionó, la MN modifica las corrientes iónicas modulando las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Un marcador muy presente en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas ha sido el aumento de la liberación de glutamato dependiente del aumento intracelular de Ca^{2+} . La disminución del influjo y de la concentración intracelular (reservas de Ca^{2+}) impide la fusión vesicular y la liberación por exocitosis del glutamato inducida por Ca^{2+} . Este es uno de los mecanismos propuestos para explicar los efectos neuroprotectores de la MN (Kim & Suh, 2009; Wang, Zhang, Yang, Ren, Xu, Frank, Ke & Luo, 2018). Aunado a la disminución en la liberación del glutamato, la MN también está involucrada en la integridad de los receptores a glutamato, al modular la expresión de subunidades proteicas del receptor NMDA (Bilousova, Dansie, Ngo, Aye, Charles, Ethell & Ethell, 2009). Con muy poco detalle, también se ha reportado que la MN aumenta la muerte neuronal en períodos vulnerables del neurodesarrollo y este efecto podría estar relacionado con la activación de la microglía (Strahan, Walker, Montgomery & Forger, 2017).

En conjunto estas evidencias sugieren que la disminución en la excitabilidad y la fuerza de transmisión sináptica por MN está asociada a la alteración de la dinámica del Ca^{2+} y de ésta derivan o convergen otras causalidades como el daño neuronal, la disminución del glutamato liberado y la integridad de sus receptores.

La disminución de la magnitud de la LTP dependiente de NMDA producida por la MN

Si la MN era capaz de modular la sinapsis glutamatérgica, el siguiente paso fue probar si estos cambios afectan a la consolidación de la sinapsis. Se probó el efecto de la MN sobre la inducción de la LTP dependiente de la activación de receptores NMDA. Anteriormente propusimos que la MN causaría alteraciones en la expresión de la LTP, los resultados obtenidos son consistentes con este planteamiento.

La MN modula la expresión de subunidades GluN2A y GluN2B. Yau y colaboradores (2018) evaluaron el efecto neuroprotector de la MN en un modelo de ratón KO Fmr1 (gen que codifica para la proteína FMRP cuya delección induce el desarrollo de síntomas del espectro autista), en este trabajo los autores demostraron que la MN aumenta y restaura la expresión de GluN2A y GluN2B en el ratón KO administrado (30 mg/kg/día p.o. por 8 semanas iniciando el 3DPN). Los autores relacionan este resultado con un desempeño exitoso en la prueba de “reconocimiento de objeto novedoso” en comparación con los ratones KO sin tratamiento. Sin embargo, en este trabajo también incluyeron un grupo WT con el mismo esquema de administración y los resultados fueron inesperados. Este grupo mostró una disminución en la expresión de GluN2A y GluN2B sin cambios significativos en el desempeño de la prueba cognitiva. La subunidad GluN2B se expresa con mayor intensidad en los cerebros jóvenes o inmaduros. Los antagonistas de la subunidad GluN2B producen una gran reducción del influjo de Ca^{2+} en las espinas dendríticas al reducir la transferencia de carga del receptor mediada por la subunidad. Los fármacos capaces de bloquear o reducir la actividad de la subunidad GluN2B bloquean y/o disminuyen la magnitud de la LTP (Shipton & Paulsen, 2014).

Una de las principales funciones de la subunidad GluN2B es mantener las concentraciones suficientes de la CaMKII, para que ésta se encuentre disponible en la densidad postsináptica y active las vías de señalización río abajo que subyacen a la expresión de la LTP. De forma más específica la interacción entre GluN2B-CaMKII fosforila residuos de serina (Ser831) en la subunidad GluA1. Esta fosforilación induce la inserción de receptores AMPA en la membrana extracelular, evento crítico en las fases más tempranas de la LTP (Shipton & Paulsen, 2014). La disminución/inhibición de la CaMKII causada por la MN ha sido reportada y propuesta como mecanismo neuroprotector(Liu, Min, Dong & Wang, 2021; Kim & Suh, 2009; Padi & Kulkarni, 2008)

La CaMKII es un elemento río arriba que en conjunto con otras cinasas (PKC y MAPK) activan al factor NF κ B. La activación de este factor de transcripción está involucrada en la respuesta inflamatoria mediada por las células gliales. La activación persistente de la glía es un marcador típico de las enfermedades neurodegenerativas. Las células gliales también tienen un papel importante en la sinapsis al participar en el ciclo del glutamato y a través de la gliotransmisión. La sobre expresión de las proteínas gliales GFAP y Cd11b ha sido relacionada con la disminución en la magnitud de la LTP y con la alteración en la consolidación de la memoria(Almolda, de Labra, Barrera, et al., 2014). Sin embargo, la activación de NF κ B tanto en glía como en neuronas también está involucrada con la síntesis de receptores de glutamato, la síntesis de proteínas reguladoras de Ca²⁺ y la activación de factores neurotróficos (BDNF) (Mattson & Meffert, 2006). Existe mucha evidencia del efecto inhibitorio de la MN sobre la activación del NF κ B en condiciones de neurodegeneración(Wang, Zhang, Yang, Ren, Xu, Frank, Ke & Luo, 2018; Padi & Kulkarni, 2008; Mattei, Djodari-Irani, Hadar, et al., 2014; Nikodemova, Duncan & Watters, 2006). La expresión de las subunidades p65, p50 y cRel que conforman a este complejo han mostrado un papel importante para la integridad de distintos tipos de memoria dependientes de hipocampo. Los modelos en ratones KO de p65 y cRel muestran una disminución en la magnitud de la LTP

en comparación con el WT (Mattson & Meffert, 2006). Por otro lado, los KO p50 muestran mejoras en el desempeño cognitivo en la prueba de “reconocimiento de objeto novedoso”. Los cerebros inmaduros expresan de manera característica heterodímeros conformados por p65/cRel. La inhibición de NF κ B por efecto de la MN se debe en parte, a que esta tetraciclina inhibe la fosforilación de las unidades proteicas conformacionales. Si esta inhibición por la MN es selectiva o en menor grado para la subunidad p50 en comparación con las subunidades p65 o cRel esclarecería los distintos efectos de la MN dependientes de la edad.

Por otro lado, la integración de la sinapsis también depende del tono inhibitorio mediado por interneuronas. En este trabajo no se inhibió el tono GABAérgico con el fin de imitar las condiciones fisiológicas en la mayor medida posible. De acuerdo con la búsqueda bibliográfica de este trabajo, se desconoce el efecto de la MN en el tono inhibitorio de las sinapsis colaterales de Schaffer-CA1 del hipocampo. Lo que si se ha demostrado es el efecto de la perfusión de MN en neuronas de la espina dorsal cuya pérdida del tono inhibitorio ha sido relacionado con el desarrollo de dolor neuropático. En registros de célula completa de voltage-clamp, Peng y colaboradores (2016) demostraron que la MN aumenta la liberación de GABA y glicina en la presinapsis y esta liberación es independiente a la actividad glutamatérgica. Aunque las interneuronas tienen un distinto perfil de expresión de receptores NMDA y sus conformaciones (en interneuronas es más alta la proporción de GluN2B) (Martina, Comas & Mealing, 2013) en comparación con las neuronas piramidales, la hipofunción de NMDA se ha asociado con el aumento de la excitabilidad de las neuronas piramidales, pero no con la disminución de esta. Lo que si ha disminuido la excitabilidad de las neuronas piramidales ha sido el aumento de la transmisión de las interneuronas, el aumento de la liberación de GABA resulta en la inhibición de la actividad excitadora (Homayoun & Moghaddam, 2007).

El comportamiento bifásico de la LTD dependiente de NMDA producido por la MN

El segundo fenómeno de plasticidad evaluado fue la inducción eléctrica de LTD mediada por la activación de receptores de glutamato, dependiente de NMDA. El nivel del influjo del Ca^{2+} a través de estos receptores define la activación de vías específicas de señalización que producen cambios moleculares y estructurales que pueden dar dos direcciones a la plasticidad. Esta plasticidad también se expresa como la disminución de la fuerza de transmisión sináptica a través de la activación de un mismo receptor, es decir, es bidireccional.

Bajo este fundamento y con lo obtenido en nuestros resultados anteriores planteamos que la MN que disminuye la excitabilidad intrínseca, disminuye la fuerza de transmisión sináptica y la magnitud de la LTP dependiente de NMDA, y por consiguiente disminuiría también la magnitud de la LTD. Sin embargo, los experimentos de LTD revelaron dos comportamientos electrofisiológicos distintos. La MN no causó efecto significativo en la inducción de LTD en un grupo de rebanadas, pero en otro produjo cambios en la fase de inducción e incluso un comportamiento bifásico (depresión, seguido por potenciación) en la polaridad de la plasticidad.

Si la MN produce una reducción en la expresión de GluN2B también es probable que afecte a la inducción de la LTD. Sin embargo, la LTD, pese a ser inducida con la activación del mismo receptor tiene un comportamiento molecular muy distinto a la LTP. Los efectos de la MN sobre la LTD no deben considerarse equivalentes o directos a los producidos en la LTP. Lo que sí debe considerarse con mucho detenimiento es la edad, en este trabajo no vimos cambios significativos en el peso, de forma interesante, el grupo que presentó el comportamiento bifásico en la inducción de la LTP también fue el grupo de animales más pesados (tabla 1). La LTD y su inducción depende mucho de la etapa del desarrollo, se ha visto que pequeños cambios en la edad de los animales pueden afectar la magnitud o incluso inhibir la expresión de la LTD (Shipton & Paulsen, 2014). Los cambios

inducidos por la MN sobre las subunidades de receptores NMDA aunado a su expresión, que naturalmente es dependiente de la edad, y la propia sensibilidad de la LTD ante estos pequeños cambios, podrían ser un motivo de la heterogeneidad en los resultados obtenidos.

Peso final MN (g)	Pendiente EPSP 90 min PLFS
183	35.56%
189	30.88%
190	43.54%
205	119.76%
219	145.39%
240	123.42%

Tabla 1. Pesos finales de las ratas utilizadas para los experimentos de LTD y el porcentaje de la pendiente respecto al porcentaje basal.

Si la expresión de GluN2B decae a medida que el cerebro madura y la MN disminuye su expresión, es probable que esta disminución en la expresión se acentúe lo suficiente para producir las alteraciones en tan solo algunos días.

Los receptores NMDA son esenciales para la inducción de la LTD, pero estos tienen un rol distinto pues permanecen activos para activar la señalización río abajo, pero con un influjo bajo de Ca^{2+} , la respuesta está mediada en mayor medida por las reservas intracelulares del ion. La LTD está favorecida por la activación de fosfatasas como la PP2B (proteína fosfatasa-calcineurina altamente sensible a Ca^{2+}) o la PP1 (proteína fosfatasa-1) que permanece activa en las fases duraderas de la LTP. Los inhibidores de esta fosfatasa han mostrado mejoras en el desempeño cognitivo en ratones jóvenes y adultos. La PP1 modula la fosforilación de la CaMKII, los receptores AMPA y el factor de transcripción CREB.

La desfosforilación de la CaMKII por PP1, por ejemplo, aumenta su autofosforilación haciéndola ultrasensible al Ca^{2+} esto aumenta la fuerza de transmisión y consecuente aumenta la potenciación. Hasta ahora no se han encontrado reportes donde se relacione la expresión de PP1 con MN, pero sí se ha reportado la interacción de la MN con otras fosfatasa.

8. Conclusiones

El tratamiento con MN en una etapa crítica del neurodesarrollo (21 DPN período de adolescencia) produce alteraciones electrofisiológicas en el circuito hipocampal. Sin embargo, esto no descarta que los efectos observados en este trabajo sean exclusivos de la edad y de la especie y es necesaria más investigación al respecto.

La MN disminuye la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 y disminuye la fuerza de transmisión sináptica de las colaterales Schaffer, lo que nos indica que la MN tiene un impacto negativo en la homeostasis iónica y en la función de los receptores de glutamato.

Como se hipotetizó, la MN disminuye la magnitud de la LTP y produjo alteraciones en la LTD, parámetros que están íntimamente relacionados con la hipofunción del receptor NMDA, la dinámica del Ca^{2+} y las respuestas celulares que controla.

9. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren la posibilidad de profundizar en el estudio de los efectos de los antibióticos sobre la consolidación del aprendizaje y la memoria. Esto es importante porque la MN es un fármaco prescrito desde edades tempranas y en períodos críticos del neurodesarrollo, por ello vale la pena evaluar este tipo de modelos en esta y en otras etapas.

En este sentido, se propone explorar con registro de campo los efectos de la MN en la plasticidad a corto plazo y la evaluación de otros parámetros electrofisiológicos como la latencia de espigas poblacionales, la magnitud de la potenciación post-tétanica y la facilitación por pulso pareado. Estos experimentos ayudarían a entender los efectos presinápticos de la MN sobre la liberación de NT y sobre el tono inhibitorio.

También sería interesante complementar este trabajo con otras técnicas electrofisiológicas que nos permitan entender los efectos de este modelo sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas. Con técnica de patch-clamp en modo de célula completa evaluar las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje ($I_{\text{Ca}^{2+}}$), las corrientes de potasio dependientes de Ca^{2+} (I_{KCa}) y las corrientes de sodio dependientes de voltaje ($I_{\text{Na}^{2+}}$). Esto para definir los efectos de la MN sobre las corrientes que dan forma al PA.

Por otro lado, también sería interesante explorar la expresión de la subunidad GluN2B para conocer el efecto de la MN sobre la conformación de receptor NMDA y entender los efectos relacionados a la edad con relevancia en el uso clínico.

Es importante explorar las posibles alteraciones en otros componentes cerebrales participantes en la sinapsis y en los cuales la MN ha mostrado tener efectos. Por ejemplo, los efectos sobre las células gliales, que al ser modulados por la activación de p65/cRel de $\text{NF}\kappa\text{B}$ pueden tener un perfil reactivo.

Esto podría verse reflejado en la expresión de proteínas del citoesqueleto en los astrocitos como GFAP, o proteínas de membrana en la microglía como CD11b. Evaluar su presencia con técnicas de inmunohistoquímica y western blot para evidenciar los efectos de la MN en neuronas y en células gliales, así como los efectos relacionados con la edad.

Finalmente se podrían implementar algunas pruebas cognitivas, como la prueba de “reconocimiento de objeto novedoso” o el “laberinto acuático de Morris” que dependen de la memoria y la orientación espacial modulados en el hipocampo, esto para demostrar los efectos de la MN en los procesos de aprendizaje y en el desempeño cognitivo.

10. Referencias

Andersson, P. y otros, 2007. *The hippocampus Book*. New York: Oxford University Press. Almolda, Beatriz, Carmen de Labra, Iliana Barrera, Agnès Gruart, Jose M. Delgado-Garcia, Nàdia Villacampa, Antonietta Vilella, Markus J. Hofer, Juan Hidalgo, Iain L. Campbell, Berta González and Bernardo Castellano (2014): "Alterations in microglial phenotype and hippocampal neuronal function in transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-10," online: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.015>>.

Anderson, P., T. V. P. Bliss and K. K. Skold (1971): *Unit Analysis of Hippocampal Population Spikes*, *Brain Res*, Springer-Verlag.

Biancalana, Matthew, Eviatar Natan, Michael J. Lenardo and Alan R. Fersht (2021): "NF- κ B Rel Subunit Exchange on a Physiological Timescale Running title: NF- κ B Rel Subunit Exchange on a Physiological Timescale," .

Bang, P. T. & Lu, B., 2004. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing research reviews elsevier*, Volumen 3, pp. 407-430.

Bilousova, T. v., L. Dansie, M. Ngo, J. Aye, J. R. Charles, D. W. Ethell and I. M. Ethell (2009): "Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model," *Journal of Medical Genetics*, 46/2, pp. 94–102.

Bilousova, T. V. y otros, 2014. Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *Journal of Medical Genetics*, Volumen 46, pp. 94-102.

Cruz, S. L., Armenta-Reséndiz, M., Carranza-Aguilar, C. J. & Galván, E. J., 2020. Minocyclin prevents neuronal hyperexcitability and neuroinflammation in medial prefrontal cortex, as well as memory impairment caused by repeated toluene inhalation in adolescent rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Issue 395.

el Dum, Ma€ , Nicolas Fourcaud-Trocm, Samuel Garcia and Nicola Kuczewski (2015):
“Afterhyperpolarization (AHP) regulates the frequency and timing of action potentials in the mitral cells of the olfactory bulb: role of olfactory experience,”
Physiol Rep, 3/5.

Elewa, H. F. y otros, 2006. Minocycline for Acute Neuroprotection.
Pharmacotherapy, 26(4), pp. 515-521.

FDA, 2005. NDA 50-445/S-028. [En línea]
Available at:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/050649023lbl.pdf
[Último acceso: 30 Julio 2020].

Fernández-Gomez, F. y otros, 2005. Involvement of mitochondrial potential and calcium buffering capacity in Minocycline cytoprotective actions. *Neurosciencie*, Volumen 133, pp. 959-967.

Flores-Soto, M. y otros, 2012. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*, 27(5), pp. 301-310.

Garcia-Álvarez, L. & Oteo, J. A., 2010. Efectos no microbianos de las tetraciclinas. *Rev Esp Quimioter*, 23(), pp. 4-11.

Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A. & Gálvez, J., 2013. Minocycline: far beyond and antibiotic. *British Journal of Pharmacology*, Issue 169, pp. 337-352.

González, J. C. y otros, 2007. Neuroprotectan minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca² signalling in hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, Volumen 26, pp. 2481-2495.

González, José Carlos, Javier Egea, María del Carmen Godino, Francisco J. Fernandez-Gomez, José Sánchez-Prieto, Luís Gandía, Antonio G. García, Joaquín

Jordán and Jesús M. Hernández-Guijo (2007): “Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca²⁺ signalling in hippocampal neurons,” *European Journal of Neuroscience*, Blackwell Publishing Ltd, 26/9, pp. 2481–2495.

Hye-Sun, K. & Yoo-Hun, S., 2009. Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behavioural Brain Research Elsevier*, Volumen 196, pp. 168-179.

Hawkins, Kimberly E., Cristin F. Gavin and David Sweatt (2016): “Long-term potentiation: A candidate cellular mechanism for information storage in the CNS,” In *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, Elsevier Science Ltd., pp. 33–64.

Hoffmann, Alexander and David Baltimore (n.d.): *Circuitry of nuclear factor kB signaling*, .

Homayoun, Houman and Bitá Moghaddam (2007): “NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons,” *Journal of Neuroscience*, 27/43, pp. 11496–11500.

Kim, Hye Sun and Yoo Hun Suh (2009): “Minocycline and neurodegenerative diseases,” *Behavioural Brain Research*.

Law, A. J. y otros, 2003. Expression of NMDA receptor NR1, NR2A, NR2B, subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *European Journal of Neuroscience*, Volumen 18, pp. 1197-1205.

Liu, Qiaofeng, Ting Min, Jun Dong and Xin Wang (2021): “Minocycline alleviates the symptoms of morphine withdrawal via the CaMKII-Ras-ERK signaling pathway,” *Neuroscience Letters*, Elsevier Ireland Ltd, 752.

Luobon Ortega, C. & Franco, J. C., 2010. Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. *Plasticidad Neuronal. iMedPub Journals*, 6(1:2).

Lüscher, C. & Malenka, R. C., 2012. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *CSH Perspect Biol*.

Lüscher, Christian and Robert C. Malenka (2012): "NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD)," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4/6, pp. 1–15.

Martina, Marzia, Tanya Comas and Geoffrey A. R. Mealing (2013): "Selective pharmacological modulation of pyramidal neurons and interneurons in the CA1 region of the rat hippocampus," *Frontiers in Pharmacology*, 4 MAR.

Mattei, Daniele, Anaïs Djodari-Irani, Ravit Hadar, Andreas Pelz, Lourdes Fernandez de Cossío, Thomas Goetz, Marina Matyash, Helmut Kettenmann, Christine Winter and Susanne A. Wolf (2014): "Minocycline rescues decrease in neurogenesis, increase in microglia cytokines and deficits in sensorimotor gating in an animal model of schizophrenia," *Brain, Behavior, and Immunity*, Academic Press Inc., 38, pp. 175–184.

Mattson, M. P. and M. K. Meffert (2006): "Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease," *Cell Death and Differentiation*.

Mattson, Mark P. (2005a): "NF- κ B in the survival and plasticity of neurons," *Neurochemical Research*, 30/6–7, pp. 883–893.

Mattson, Mark P. (2005b): "NF- κ B in the survival and plasticity of neurons," *Neurochemical Research*, 30/6–7, pp. 883–893.

Medina Marín, A. M. & Betancourth, M. I., 2002. Sistema glutamatérgico primera parte: sinaptología, homeoastasis y muerte celular. *Revista de Psiquiatría*, XXXI(3), pp. 187-212.

Milane, Aline, Christine Fernandez, Sarah Vautier, Gilbert Bensimon, Vincent Meininger and Robert Farinotti (2007): "Minocycline and riluzole brain disposition: Interactions with p-glycoprotein at the blood-brain barrier," *Journal of Neurochemistry*, 103/1, pp. 164–173.

Meldrum , B. S., 2000. Glutamate and Glutamine in the Brain. *American Society for Nutritional Sciences.*, Volumen 130, pp. 1007S-1015S.

Möller, T. y otros, 2016. Critical Data-Based Re-Evaluation of Mynocicline as a Putative Specific Microglia Inhibitor. *GLIA*, 00(00), pp. 000-000.

Nagy, V. y otros, 2006. Matriz Metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *The Journal of Neuroscience*, 26(7), pp. 1923-1934.

Nikodemova, M., Duncan , I. D. & Watters, J., 2006. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IκBα degradation in a stimulus-specific manner in micrglia. *Journal of Neurochemistry*, pp. 314-323.

Nikitin, V. P., S. A. Kozyrev, S. v Solntseva and P. v Nikitin (2021): "Protein synthesis inhibitor administration before a reminder caused recovery from amnesia induced by memory reconsolidation impairment with NMDA glutamate receptor antagonist," *Brain Research Bulletin*, 171, pp. 44–55, online: <<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.03.008>>.

Nikodemova, Maria, Ian D. Duncan and Jyoti J. Watters (2006): "Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IκBα

degradation in a stimulus-specific manner in microglia,” *Journal of Neurochemistry*, 96/2, pp. 314–323.

Ota, Y., Zenneti, A. T. & Hallock, R. M., 2013. The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plasticity*, Volumen 2013, p. 11.

Padi, Satyanarayana S. V. and Shrinivas K. Kulkarni (2008): “Minocycline prevents the development of neuropathic pain, but not acute pain: Possible anti-inflammatory and antioxidant mechanisms,” *European Journal of Pharmacology*, 601/1–3, pp. 79–87.

Plane, J. M., Shen, Y., Pleasure, D. E. & Deng, W., 2010. Prospects for Minocycline Neuroprotection. *Arch Neurol*, 67(12), pp. 1442-1448.

Paoletti, Pierre and Jacques Neyton (2007): “NMDA receptor subunits: function and pharmacology,” *Current Opinion in Pharmacology*.

Reyes-Haro, D., Bulavina, L. & Pivneva, T., 2014. La glía el pegamento de las ideas. *Ciencia*, Volumen 7, pp. 12-18.

Ribeiro, P. O. y otros, 2014. Clinically relevant concentration of ketamine mainly affect LTP rather than basal excitatory synaptic transmission and do not change paired-pulse facilitation in mouse hippocampal slices. *Elsevier*, pp. 1-8.

Rudy, J. W., 2014. Synaptic basis of memories. En: *The neurobiology of learning and memory*. Mass: Sinauer Associates Inc., pp. 19-40.

Ryu, J. K. y otros, 2004. Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by B-amyloid peptide in rat hippocampus. *GLIA*, Volumen 90, pp. 85-90.

Santa-Cecilia, F. V. y otros, 2016. Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF- κ B Signaling Pathways. *Neurotox Res*, Volumen 29, pp. 447-459.

Seabrook, T. J., Jiang, L., Maier, M. & Lemere, C. A., 2006. Minocycline affects microglia activation, AB deposition, and behavior in APP-tg Mice. *Glia*, Volumen 53, pp. 776-782.

Singh, D., Srivastava, S. K., Chaudhuri, T. K. & Upadhyay, G., 2015. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2(19).

Sayer, Rod J., Michael J. Friedlander and Stephen J. Redman (1990): "The Time Course and Amplitude of EPSPs Evoked at Synapses Between Pairs of CA3/CA1 Neurons in the Hippocampal Slice," *The Journal of Neuroscience*, 70/3, pp. 828–838.

Schwartzkroin, Philip A. (1975): *CHARACTERISTICS OF CA1 NEURONS RECORDED INTRACELLULARLY IN THE HIPPOCAMPAL IN VITRO SLICE PREPARATION*, *Brain Research*.

Shipton, Olivia A. and Ole Paulsen (2014): "GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Royal Society.

Strahan, J. Alex, William H. Walker, Taylor R. Montgomery and Nancy G. Forger (2017): "Minocycline causes widespread cell death and increases microglial labeling in the neonatal mouse brain," *Developmental Neurobiology*, John Wiley and Sons Inc., 77/6, pp. 753–766.

Verkhatsky, A. & Kirchhoff, F., 2007. NMDA Receptors in Glia. *The Neuroscientist*, 13(1), pp. 28-37.

Yau, S. y otros, 2018. Chronic minocycline treatment improves hippocampal neuronal structure, NMDA receptor function, and memory processing in Fmr1 knockout mice. *Neurology of Disease Elsevier*, Volumen 113, pp. 11-22.

Yong Wee, V. y otros, 2004. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol*, Volumen 3, pp. 744-751.

Zemke, D. & Majid, M., 2004. The potential of Minocycline for Neuroprotection in Human Neurologic Disease. *Clin Neuropharmacol*, Volumen 27, pp. 293-298.

Wang, Xin, Kai Zhang, Fanmuyi Yang, Zhenhua Ren, Mei Xu, Jacqueline A. Frank, Zun ji Ke and Jia Luo (2018): "Minocycline protects developing brain against ethanol-induced damage," *Neuropharmacology*, Elsevier Ltd, 129, pp. 84–99.