

Influencia de la Cinta Aquatitan en las Células Nerviosas del Sistema Nervioso Central

Martin Korte*

Facultad de Ciencias de la Vida, Departamento de Fisiología, TU Braunschweig, Instituto Zoológico, Mendelssohnstr. 4, D38106, Alemania

Recibido el 4 de febrero de 2008; Aceptado el 6 de febrero de 2008

Resumen: se analizó la Cinta de Aquatitan (ATT, por sus siglas en inglés) para estudiar el posible impacto en el tejido neuronal, en concreto en las neuronas piramidales del hipocampo de ratón (rodajas agudas), y para probar que la Cinta de Aquatitan puede utilizarse en el tratamiento del dolor. La Cinta de Aquatitan no alteró de ningún modo la transmisión sináptica basal, lo que indica que no provocó efectos secundarios en las neuronas del sistema nervioso central del ratón. Además logramos mostrar que la plasticidad sináptica (potenciación sináptica a largo plazo, LTP, por sus siglas en inglés), el potencial de la membrana en reposo y la tasa de disparo (frecuencia de acción potencial) de las neuronas piramidales del hipocampo sufrieron una alteración debida a la influencia de la ATT. Todos los experimentos han sido realizados de tal forma que el científico encargado del experimento no sabía qué cinta estaba utilizando en cada concentración.

Palabras Clave: hipocampo, Aquatitan, dolor, memoria del dolor, potenciación a largo plazo

Introducción

El objeto de este estudio era demostrar si a) la Cinta de Aquatitan puede ejercer una influencia en los procesos biológicos de las células; y b) si la Cinta de Aquatitan puede ejercer una influencia específica en la señalización neuronal y el procesamiento de información en el sistema nervioso central. Algunos informes indican que la Cinta de Aquatitan puede incidir en la percepción del dolor en los atletas y el sustrato neuronal subyacente ha sido objeto de análisis en este estudio. Para lograr estos objetivos, medimos los parámetros electrofisiológicos de la transmisión sináptica basal y la plasticidad sináptica de las neuronas en rodajas agudas de hipocampo de ratón. El ratón se ha utilizado como modelo dado que su uso se ha consolidado como el más adecuado para realizar estudios sobre las propiedades de las células nerviosas que no pueden realizarse directamente en humanos. En concreto, las neuronas piramidales del hipocampo han sido ampliamente estudiadas en su capacidad de procesar el dolor (por ejemplo [1,2]). La plasticidad sináptica también está ampliamente descrita en el hipocampo [3] y podría constituir el mecanismo subyacente de la memoria del dolor, un término empleado para describir la sensibilización a la experiencia sensorial de los mecanismos centrales [4]. Se sabe que un trauma u

operación quirúrgica puede causar la sensibilización de las terminaciones nerviosas nociceptivas periféricas. Este fenómeno suele ir acompañado de la sensibilización de las neuronas en el sistema nervioso central, que se denomina la sensibilización central. Por otro lado, la sensibilización periférica suele desaparecer cuando la causa originaria del dolor desaparece. Sin embargo, la sensibilización central puede persistir tras la resolución de la lesión y puede contribuir a la aparición del dolor crónico. Por lo tanto la lesión original puede dejar una huella del dolor original en la memoria a través de los mecanismos de plasticidad sináptica.

En el estudio realizado se analizó el efecto de la Cinta de Aquatitan en las neuronas y se logró mostrar el resultado de evaluar la transmisión sináptica basal, la plasticidad sináptica, el potencial de la membrana en reposo y la tasa de disparo de las neuronas piramidales individuales bajo el efecto de distintas cintas de Aquatitan en comparación con una cinta de control sin Aquatitan. Se garantizó que la cinta no entrara en contacto directo con la lámina de tejido de hipocampo para mimetizar la situación real en la que las cintas de Aquatitan se colocan en la piel de los individuos.

Materiales y Métodos

La Cinta de Aquatitan es un producto de la empresa Phiten Co., Ltd, empresa que ha logrado disolver el titanio en agua. Para investigar el efecto de la Cinta de Aquatitan en las neuronas piramidales, se prepararon rodajas agudas de hipocampo de ratón y se mantuvieron según los procedimientos habituales (ASCF: 124 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,25 mM KH_2PO_4 , 2mM Mg_2SO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 2,5 mM CaCl_2 , 10 mM Glucosa; Temperatura $32 \pm 0,2^\circ \text{C}$). Se utilizaron electrodos de tungsteno monopolares en la zona colateral Schaffer CA3 para la estimulación. La excitación de los potenciales de campo sináptico se realizó con una frecuencia de 0,1 Hz. Las respuestas se registraron en electrodos de vidrio situados en la región dendrítica apical (stratum radiatum) de las neuronas piramidales CA1. Se calcula la pendiente del potencial excitatorio postsináptico (EPSP, por su siglas en inglés) y se utiliza para la medición de la fuerza sináptica. La inducción de la LTP se realiza mediante un tétanos de 3x30 pulsos (100 Hz, 50 μs de duración, 5 s ISI) con fuerza de estímulo de prueba. Para el procedimiento de registro intracelular se despolarizó la célula postsináptica mediante una inyección de corriente (1 nA aplicado durante 100 ms) y se midió la frecuencia de potenciales de acción durante la despolarización bajo la influencia de diversas concentraciones de Cinta Aquatitan en comparación con la cinta placebo. En todos los experimentos el científico desconocía el tipo de cinta, la concentración de la cinta y cuál era la cinta placebo entre todas las cintas utilizadas durante los experimentos en sus análisis. Los experimentos se consideran de importancia significativa cuando el valor p del test t de Student equivale a $<0,05$. Para optimizar las condiciones de registro en el experimento con la Cinta Aquatitan se creó una interfaz de cámara de registro. Esta cámara especial permitió experimentar con la Cinta de Aquatitan en diferentes concentraciones y evitar al mismo tiempo el contacto directo de las cintas con las rodajas agudas de ACSF (fluido cerebro espinal artificial). Esta cámara puede ser utilizada para registrar y medir el tamaño/pendiente del EPSP y facilitación por pulsos pareados (PPF por sus siglas en inglés) así como la LTP. La rodaja aguda utilizada en esta cámara se sitúa en una red. La lámina se coloca en un ambiente alto en humedad con un 95% de O_2

y un 5% de CO_2 (Carbógeno), véanse los detalles del experimento en [5] y [6].

Todos los experimentos se realizaron de tal modo que el científico que realizaba el experimento desconocía qué cinta se utilizaba en cada concentración.

Resultados

Transmisión sináptica basal

En cada serie de experimentos se utilizaron 12-13 rodajas agudas de hipocampo. Para la cinta Aquatitan se evaluaron tres concentraciones diferentes (7 mg/l, 100 mg/l y 600 mg/l) contra una Cinta Placebo sin Aquatitan en la zona Colateral Schaffer CA3-CA1 del hipocampo del ratón. Se realizaron registros extraceulares en la región CA1 del hipocampo.

fEPSP es la abreviación utilizada para el campo del potencial excitatorio postsináptico y sirve de indicador de la función de la transmisión sináptica basal. No se observaron efectos secundarios de la cinta Aquatitan en el tamaño de fEPSP en ninguna de las concentraciones utilizadas y en ninguna de las fuerzas de estímulo aplicadas (calibradas con ayuda de las fibras poblacionales, *fiber volley*). Esto indica que las cintas Aquatitan no producen efectos citotóxicos secundarios en las neuronas piramidales del hipocampo del ratón, que son extremadamente sensibles. Además se midió la facilitación por pulsos pareados. La PPF es indicadora del buen estado de la transmisión basal sináptica y la plasticidad sináptica a corto plazo. Constituye un indicador especialmente valorado para la función presináptica que puede verse influenciada por las cintas. La medición de la PPF se realizó del siguiente modo: se realizaron dos pulsos con un intervalo entre estímulos de 10, 20, 40, 80 y 160 ms; entonces se calculó el ratio del segundo pulso en relación con el primero y se comparó con los diversos grupos de tratamiento. Se logró mostrar que la ATT no altera el tamaño de los pulsos pareados observados en ninguna concentración. Este dato, junto con las mediciones del tamaño del EPSP demuestra que las cintas de Aquatitan no son tóxicas para el tejido neuronal, que es especialmente sensible a cualquier sustancia tóxica. La transmisión sináptica basal no se ve alterada por la presencia de la Cinta Aquatitan

independientemente de la concentración de Aquatitan utilizada en diferentes condiciones experimentales.

Plasticidad sináptica (Potenciación a Largo Plazo, LTP)

Synaptic plasticity (Long-Term potentiation, LTP)

For the measurements of Long-term potentiation (LTP),

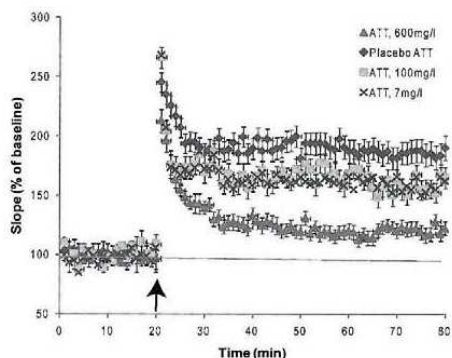


Fig.1 Mediciones de la LTP en rodajas agudas de hipocampo bajo la influencia de ATT (Cinta Aquatitan) con diferentes concentraciones y en comparación con la cinta placebo. Tras 20 minutos de registros de las rodajas agudas del hipocampo, se aplicó un tétanos a todas las rodajas (100 Hz, 3x) que en condiciones normales induciría la potenciación a largo plazo, LTP, pero que se ve reducida en presencia de ATT con concentraciones elevadas (600 mg/l). ATT: Cinta Aquatitan, Placebo: cintas de control que no se sumergen ni se impregnan con Aquatitan. Barras de error: error estándar de la media. ATT (600 mg/l) muestra una LTP notablemente distinta en comparación con la cinta placebo ($p < 0,05$, test t de Student).

Línea vertical: pendiente (% de las mediciones basales)

Línea horizontal: Tiempo (min)

Para la medición de la Potenciación a largo plazo (LTP) se utilizó el modelo consolidado de plasticidad sináptica (Bliss and Collingridge, 1993) y las rodajas de hipocampo. La estimulación de las fibras (mimetiza el input, por ejemplo, la experiencia de dolor) se aplicó en la zona CA3 del hipocampo realizando el registro de las neuronas piramidales de la zona CA1 del hipocampo. El tamaño de la pendiente del campo de EPSP fue utilizado para medir la fuerza sináptica y fue analizado con la Cinta Aquatitan (ATT). El tamaño EPSP no sufrió alteraciones por las cintas y se lograron registrar mediciones basales estables (Fig. 1) Tras 20 minutos de mediciones basales se aplicó un estímulo de alta frecuencia (que mimetiza, por ejemplo, una experiencia muy dolorosa, ver [6]). En las cintas placebo de ATT esto conlleva una inducción normal del fenómeno, ampliamente descrito, de la Potenciación a largo plazo en estas rodajas

(Fig. 1). En otros términos, estas sinapsis se reforzaron, lo que implica que si estas sinapsis son las encargadas de procesar la información relacionada con el dolor, un estímulo menos doloroso sería suficiente para provocar una experiencia dolorosa [4].

Bajo la influencia de la Cinta Aquatitan, en contraste con la cinta placebo, puede observarse un deterioro de esta Potenciación a largo plazo (LTP) en las neuronas piramidales del hipocampo (Fig. 1), dependiendo de la concentración. Bajo la influencia de la ATT, con la concentración más elevada de Aquatitan (600 mg/l) puede observarse la inducción de la LTP pero es notablemente menor en comparación con la cinta placebo ($p < 0,05$, test t de Student). Para la ATT con mg/l y la ATT con 100 mg/l ya se observa cierta reducción de la LTP que no alcanza el nivel relevante de $p < 0,05$ pero la tendencia es claramente visible y coherente. Las rodajas bajo la influencia de las cintas de Aquatitan muestran una reducción de su capacidad de atravesar una potenciación a largo plazo (LTP) dependiendo de la concentración. Esto indica que la plasticidad sináptica bajo influencia de la cinta de Aquatitan se ve alterada.

Estos resultados podrían tener una gran relevancia para la investigación de los mecanismos de la memoria del dolor, según los cuales la plasticidad sináptica también desempeña una función en este punto [4]. Es posible que las Cintas de Aquatitan puedan intervenir en este punto e inhibir la formación de la memoria del dolor.

Registros de células individuales

También se utilizaron registros de células individuales (registros intracelulares) en rodajas del hipocampo para explorar el mecanismo mediante el cual la Cinta de Aquatitan tiene un impacto en el procesamiento neuronal. Este método permite medir con gran precisión (células individuales) cualquier cambio en el potencial de descanso de la membrana o las tasas de disparo de los potenciales de acción. Este método permitió comparar la acción de la Cinta Aquatitan sobre neuronas piramidales aisladas del hipocampo en diferentes concentraciones.

Con estos experimentos se muestra que la ATT tiene un efecto dependiendo de la concentración en las neuronas piramidales individuales del hipocampo. Bajo la

influencia de la Cinta de Aquatitan (600 mg/l) se produce una reducción media del potencial de descanso de la membrana que oscila desde $-64 \pm 1,4$ mV en la cinta placebo a $-69 \pm 2,5$ mV ($p < 0,05$, test t de Student). La cinta normal y las cintas ATT (100 mg/l) ya muestran una tendencia de reducción del potencial de descanso de la membrana pero esta reducción no conlleva una reducción significativa del potencial de la membrana en reposo.

Aplicando un estímulo de despolarización largo de 100 ms a la neurona piramidal individual puede medirse la tasa de disparo del potencial de acción. Dado que se había producido una reducción del potencial de la membrana en reposo asumimos que la tasa de disparo bajo la influencia de cintas con una concentración elevada sería menor. Y en efecto, observamos que: si se aplica un estímulo de despolarización de 100 ms, se inducen 17 potenciales de acción de media en la cinta placebo y si se utiliza la Cinta Aquatitan (600 mg/l) la frecuencia de los potenciales de acción se ve reducida a 13 potenciales de acción de media, con un efecto notable ($p < 0,05$). Incluso con la Cinta Aquatitan normal y una ATT con una concentración de 100 mg/l observamos una tendencia a la reducción de la tasa de disparo del potencial de acción en comparación con la cinta placebo, pero este efecto no es relevante.

Puede concluirse, por lo tanto, que la Cinta Aquatitan actúa dependiendo de la concentración en el potencial de la membrana en reposo y la tasa de disparo del potencial de acción de las neuronas piramidales del hipocampo, viéndose ambas reducidas bajo la influencia de una ATT con concentración elevada que incrementa por lo tanto el umbral de inducción de la LTP.

El potencial la membrana en reposo y la tasa de disparo de la acción potencial se ven alterados

En la Fig. 2 se introducen los datos medios de diferentes concentraciones de Cinta Aquatitan en un gráfico para efectuar los registros de las células individuales. Primero se muestra el potencial de la membrana en reposo (para cada cinta con cierta concentración se han realizado 12 experimentos). Estos experimentos han demostrado fehacientemente que la Cinta de Aquatitan con una concentración de 600 mg/l puede afectar el potencial de la

membrana en reposo de las neuronas piramidales del hipocampo. El potencial de la membrana en reposo se estabiliza bajo la influencia de ATT con una concentración elevada a un valor reducido y esta diferencia es significativa si se compara con la cinta placebo ($p < 0,05$, test t de Student). Con una cinta de 100mg/l, ya puede observarse una tendencia para las dos cintas sometidas a examen.

El efecto de la Cinta de Aquatitan para todos los experimentos descritos aquí en todas las concentraciones empleadas podría bloquearse mediante una placa de plomo de 0,5 cm de diámetro colocada entre la lámina de hipocampo y la cinta de Aquatitan (no se muestran datos).

Conclusión

Los experimentos descritos más arriba muestran de forma fehaciente que la Cinta Aquatitan (600 mg/l) tiene efectos en la plasticidad sináptica (¿memoria de dolor?) y en las neuronas piramidales individuales puede reducir la tasa de disparo del potencial de acción de forma significativa, en comparación con las cintas placebo utilizadas ($p < 0,05$, test t de Student). Las ATT con 100 mg/l ya muestran una tendencia clara a la reducción de las tasas de disparo, pero estos resultados no diferían significativamente de las cintas placebo. Los experimentos en la LTP/plasticidad sináptica dejan la puerta abierta a la posibilidad de que la Cinta Aquatitan con una concentración de 600 mg/l sea útil para aliviar el dolor en humanos sin efectos secundarios. Se han realizado experimentos similares en la espina dorsal para medir de forma más directa la modulación de los conductos que procesan el dolor en animales.

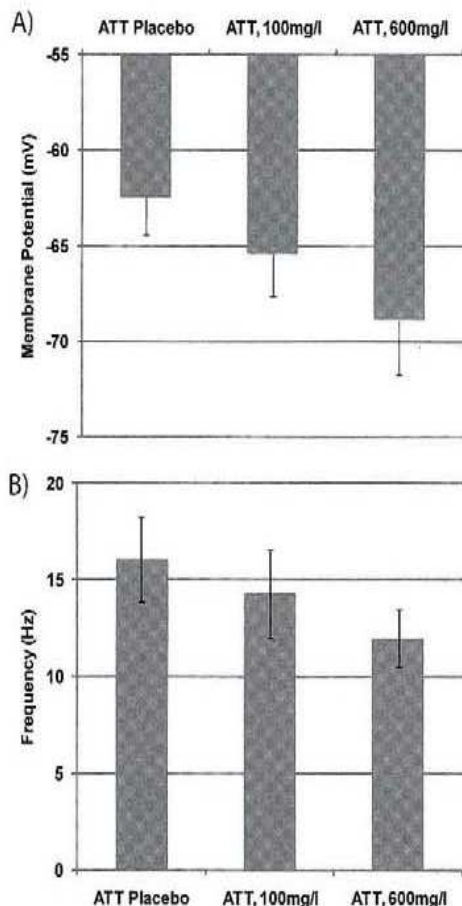


Fig 2

A) En este gráfico puede verse el tipo de cinta (Cinta Aquatitan, ATT) con concentraciones determinadas (Placebo, 100 mg/l y 600 mg/l) en comparación con el potencial de la membrana en reposo de las neuronas piramidales del hipocampo en la zona CA1. Se realizaron registros intracelulares con un amplificador Axclamp2B. Barras de error: error estándar de la media. Para cada concentración en cinta se realizaron 12 experimentos. La diferencia entre ATT (600 mg/l) es notable en comparación con cinta de control. B) Se muestra la frecuencia del potencial de acción de la tasa de disparo para neuronas piramidales de CA1 bajo la influencia de Cintas Aquatitan en diferentes concentraciones. Se utilizó una cinta de placebo como cinta de control de las dos concentraciones de la cinta (100 mg/l y 600 mg/l). En el caso de la cinta de 600 mg/l, la diferencia en la tasa de disparo del potencial de acción en comparación con la cinta placebo es significativa ($p < 0,05$, Test t de Student). En el caso de la cinta de 100 mg/l, se observa una tendencia a una menor tasa de disparo pero no alcanza un nivel relevante estadísticamente en comparación con la cinta placebo. Los registros intracelulares se realizaron con un amplificador Axoclamp2B; barras de error; error estándar de la media. Se utilizaron doce rodajas para todas las condiciones experimentales.

Línea vertical A): Potencial de membrana (mV)

Línea vertical B): Frecuencia (Hz)

Referencias

- [1] Soleimannejad, E., Naghdi, N., Semmanian, S., Fathollahi, Y., and Kazemnejad, A.: Anticonceptive effect of intrahippocampal CA1 and dentate gyrus injection of MK801 and AP5 in the formalin test in adult male rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **562**, 39-46, 2007.
- [2] Becker A., Grecksch, G., and Schroder, H.: Pain sensitivity is altered in animals after subchronic ketamine treatment. *Psychopharmacology (Berl.)*, **189**, 237-247, 2006.
- [3] Bliss, T.V. and Collingridge, G.L.: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361** (6407), 31-39, 1993.
- [4] Sandkuhler, J.: Learning and memory in pain pathways. *Pain*, **88**, 113-118, 2000.
- [5] Gartner, A., Polanu, D.G., Staiger, V., Sciarretta, C., Minichiello, Ll., Thoenen, H.,

Bonhoeffer, T., and Korte, M: Hippocampal long-term potentiation is supported by pre-synaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling. *J. Neurosci.*, **26**, 3496-3504, 2006.

[6] Rösch, H., Schweigreiter, R., Barde, Y.-A., Bonhoeffer, T., and Korte, M.: The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. Anonymous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7362-7367, 2005.