

ARTÍCULOS ORIGINALES

Modificaciones en la plasticidad hipocampal a corto plazo por efecto de un péptido diseñado y sintetizado con base en la estructura de una conotoxina*

ALAIN RIVEROS RIVERA¹, ALEJANDRA GUERRERO²

Resumen

Introducción: El diseño de instrumentos o moléculas inspiradas en la naturaleza ha permitido avanzar en diferentes áreas de la ciencia y tecnología. **Objetivo:** Evaluar cambios plásticos a corto plazo desencadenados por la administración intraperitoneal de un péptido agonista del receptor de glutamato NMDA. **Materiales y métodos:** Se utilizaron ratas macho divididas en grupo péptido (a quienes se administró peritonealmente el péptido) y grupo control (a quienes se administró peritonealmente el vehículo). Por técnicas de estereotaxia se localizaron electrodos de estimulación y registro en las áreas hipocampales CA3 y CA1 respectivamente, con el ánimo de obtener los potenciales de campo y analizar cambios en su pendiente y amplitud por la aplicación de pares de estímulos, antes y después de la administración del péptido. **Resultados:** Aunque con la administración del péptido no hay cambios en variables sistémicas como la temperatura o la frecuencia cardíaca, sí se pueden modificar los potenciales de campo, específicamente cuando el intervalo entre pares de estímulos es más corto (40 a 80 ms). **Conclusión:** El péptido evaluado en el presente trabajo tiene efectos en la facilitación por pulsos pareados tanto en la amplitud como en la pendiente de potenciales de campo en el hipocampo de ratas, pero en los intervalos entre estímulos más cortos.

Palabras clave: conotoxinas, toxinología, hipocampo.

* Créditos a los departamentos de Ciencias Fisiológicas, Pontificia Universidad Javeriana, Universidad Nacional de Colombia y Universidad Militar Nueva Granada.

1. Médico fisiólogo. Máster en Neurociencias. Docente e investigador, Pontificia Universidad Javeriana-Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.
2. Enfermera investigadora, Fundación Santa Fe de Bogotá, Colombia.

Recibido: 18/01/2012.

Revisado: 27/01/2012.

Aceptado: 04/09/2012

Title: Changes in Short Term Hippocampal Plasticity caused by a Peptide Designed and Synthesized based on the Structure of a Conotoxine

Abstract

Introduction: Designing bio-inspired devices or molecules has been a longstanding method supporting multiple advances in science and technology. **Objective:** To test the potential effect of intraperitoneal administration of the bio-inspired peptide on short-term plasticity. **Materials and methods:** Male rats in two groups (peptide treated and control) were used for registration of hippocampal field potentials from CA1, after paired stimuli in CA3 contra lateral area. **Results:** Amplitude and slope of field potentials', both before and after peptide administration, showed no changes in systemic factors (temperature and heart rate), but statistical significance in short term plasticity in small inter stimuli interval (40 to 80 ms). **Conclusion:** The current research shows effects on paired pulse facilitation caused by peptide treatment, specifically on inter stimuli interval shorter.

Key words: Conotoxins, toxinology, hippocampus.

Introducción

La modulación sináptica del hipocampo a través de la modificación de la expresión de los receptores NMDA para el glutamato (RNMDA) ha demostrado tener efectos en el comportamiento y el aprendizaje en ratones [1]. Sin embargo, dichas modificaciones, al no ser específicas, se han acompañado de una constelación de efectos en otros sistemas que utilizan dicho neurotransmisor [2-8]. El diseño de factores con mayor especificidad sobre el RNMDA

hipocampal se ha abordado mediante la manipulación de agonistas que interactúan con la subunidad NR2B de dicho receptor [9-15].

Aunque la expresión de la subunidad en el receptor decrece con el tiempo, tiene una localización predominante sobre el hipocampo, aun en el cerebro maduro [16]. La utilización del péptido BLMP-101 (un sintético derivado de la estructura de una conotoxina con alta afinidad por la subunidad NR2B del RNMDA) demostró modificar el aprendizaje espacial en el laberinto de Morris, un modelo de evaluación de la memoria relacionado con el procesamiento hipocampal [17].

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó la evaluación del mismo péptido en un modelo electrofisiológico de plasticidad sináptica a corto plazo, la facilitación por pulsos pareados (FPP). Aunque de predominio presináptico, dicho fenómeno de plasticidad lo pueden modificar componentes a ambos lados de la sinapsis donde existen evidencias de la presencia del RNMDA [18-20]. La presente investigación pretende evaluar el efecto de un péptido a partir de la estructura de una conotoxina en la FPP en un circuito hipocampal.

Métodos

Selección y descripción de animales

Se mantuvieron once machos de *Rattus norvegicus*, cepa Wistar, bajo un ciclo luz-

oscuridad de 12:12 y a una temperatura ambiente de 21 °C hasta alcanzar los 110 ± 2 días de edad con un peso promedio de 310 ± 26 g. Los especímenes se dividieron en dos grupos, a uno de los cuales se le administró por vía intraperitoneal el péptido BLMP-101 (GP = grupo péptido); mientras que al otro, por la misma vía, solo se le administró el vehículo y por ello sirvió como grupo control (GC = grupo control).

Registro electrofisiológico

La inducción anestésica, el procedimiento quirúrgico para la implantación de los electrodos y la técnica de registro, fueron descritos previamente [21]. Además, se dispuso un electrodo de temperatura en la región abdominal de la rata y la configuración clásica de Einthoven para obtener la derivación electrocardiográfica DII. Estas dos variables fueron monitorizadas antes del experimento, durante este y al final. También se evaluó permanentemente el electrocardiograma a la par que se obtenían los registros hipocampales. Una vez obtenida la estabilización del registro y la curva estímulo-respuesta, se procedió a aplicar el siguiente patrón de estímulos:

Treinta pares de estímulos con un intervalo entre estímulos (IEE) de 40 ms y con un intervalo entre pares de 10 s, al cabo de los cuales se repitió la misma pauta de estímulo pero cambiando paulatinamente a IEE de 60, 80, 100,

120, 150 y 200 ms. De esta manera, se aplicaron un total de 210 pares de estímulos, tras lo cual se administró por ensayo ciego el péptido (dosis de 0,64 mg/kg) o el vehículo por vía intraperitoneal. Los registros hipocampales continuaron hasta el minuto 20 postadministración con un IEE de 50 ms, para luego repetir la misma pauta de la fase inicial (210 pares con los mismos IEE). Al terminar la segunda fase, las ratas se sacrificaron para extraerles el encéfalo, el cual fue preservado hasta el momento en que se realizaron los cortes por congelación (20 μ m de grosor) con el ánimo de verificar la posición de los electrodos. La figura 1 muestra la posición de los electrodos de estimulación y los de registro.

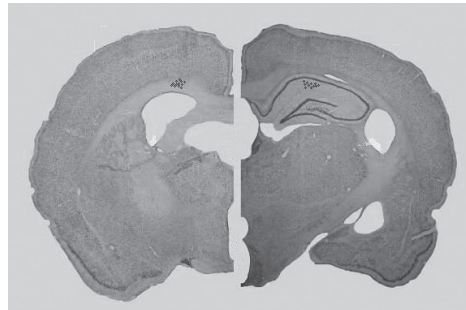


Figura 1. Localización esquemática de los once electrodos de estimulación en la fimbria derecha de la rata (izquierda en la imagen) a -1,3 mm de bregma y los correspondientes de registro en la región CA1 izquierda de la rata (derecha de la imagen) a -3,6 mm de bregma

Información técnica

Los registros electroencefalográficos y electrocardiográficos se realizaron con amplificadores diferenciales ML132

conectados a la unidad Powerlab 4ST (ADInstruments®). El electrodo bipolar de estimulación era de cobre con un diámetro de 100 μm ; mientras que para el registro se utilizaron los electrodos de tungsteno 5771 con una impedancia de 5 M Ω (A-M Systems Electrodes®).

En cuanto al sensor térmico, se utilizó el electrodo MLT409/D conectado al acondicionador pod ML309 (ADInstruments®). Para el corte histológico de los encéfalos se utilizó el criostato de congelación Thermo Shandon Cryotome. Para la colecta de los registros se utilizó el programa Scope® versión 3.7 (ADInstruments), mientras que para la representación gráfica de los resultados se utilizó Origi versión 5.0 (Microcal Software Inc.).

Tabulación y análisis estadístico

Para el análisis estadístico los resultados se procesaron usando el paquete SAS® para Windows (SAS Institute Inc.). A menos que sea indicado de otra manera, los datos son representados por la media \pm el error estándar. Los datos colectados se analizaron utilizando la prueba de análisis de varianza (Anova) de medidas repetidas y análisis *post hoc* con Wilks' Lambda y Roy's Greatest Root. Este último análisis permite evaluar el efecto de cada IEE con dependencia no solo del mismo IEE, sino de los otros valores de esta variable (los otros seis IEE).

Los datos tabulados se obtienen de la amplitud o la pendiente promedio de ascenso del potencial excitatorio post-sináptico (PEPS) y se procesan de dos maneras. La primera tabulación solo utilizaba el PEPS obtenido por el primer estímulo y evaluaba su comportamiento a lo largo del tiempo; por otra parte, la segunda tabulación utilizaba el cociente del segundo PEPS sobre el primer PEPS en cada grupo de IEE (el promedio de los 30 pares).

Resultados

No existen efectos sistémicos por la administración intraperitoneal del péptido BLMP-101

Investigaciones anteriores han demostrado que el péptido no tiene efectos en procesos globales como el movimiento o el umbral del dolor [17]. En esta investigación se evaluó el posible efecto que se pudiera tener en la temperatura y la variabilidad de frecuencia cardiaca. En la figura 2 se muestra el comportamiento de dichas variables; los datos se obtuvieron antes del inicio de la cirugía, en el intervalo antes del tratamiento y después de este, y al final del segundo tratamiento. No existen diferencias significativas entre la temperatura promedio antes del GP, durante este y después, comparada con la del GC. En cuanto a la medición de la frecuencia cardiaca, se evaluó a través de registro en carta que permitió obtener valores promedio de

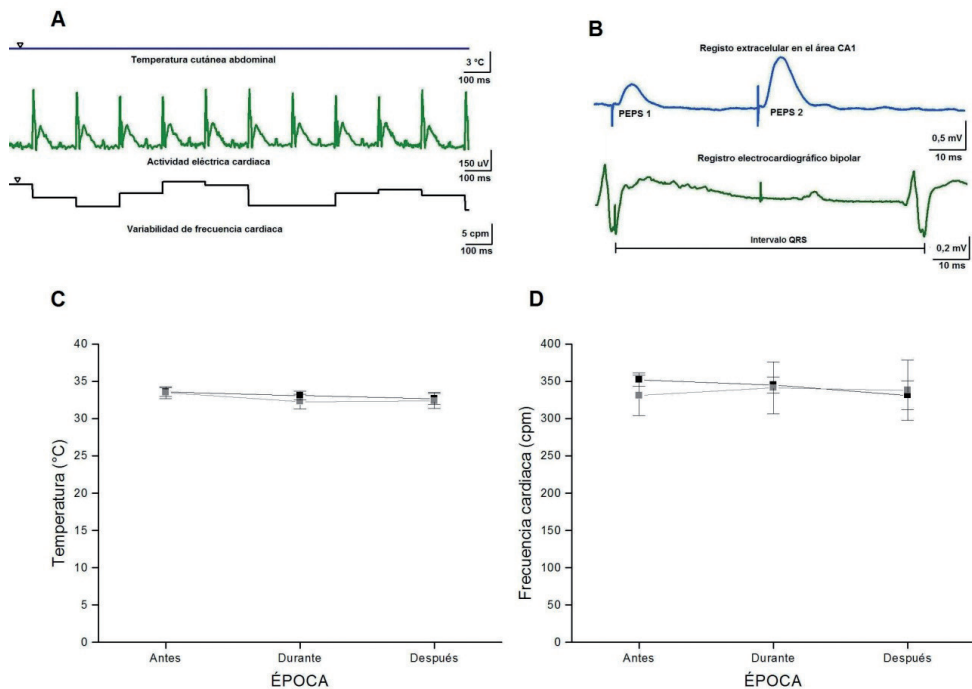


Figura 2. Evaluación del efecto del péptido en la temperatura y la frecuencia cardíaca

A) Registro en el que se evaluó la temperatura cutánea, el electrocardiograma y la variabilidad de frecuencia cardíaca simultáneamente. Este se realizó durante un minuto en tres ocasiones a lo largo del experimento: antes del inicio de la realización de la curva estímulo-respuesta, después de la administración del tratamiento y al final del experimento. El triángulo en el registro de temperatura marca 34 °C, y el del registro de variabilidad de frecuencia cardíaca, 340 ciclos por minuto. B) Además de la monitorización en tres fases del experimento, se hicieron registros electrocardiográficos simultáneos a la actividad hipocámpica. El registro superior muestra los potenciales de campo desencadenados por el par de estímulos, y en la parte inferior, el registro sincrónico del electrocardiograma. En este trazado se observan también los artefactos de estímulo y el intervalo RR que sirvió como referencia para la evaluación continua de la frecuencia cardíaca. C) La figura muestra la temperatura promedio en grados centígrados del GP (negro) y el GC (gris) durante tres periodos del experimento. Antes, registró la temperatura cuando los electrodos ya se habían implantado pero no se había iniciado la estimulación con pulsos pareados. Durante, registró la temperatura inmediatamente después de finalizada la primera serie de IEE. Después, registró la temperatura al terminar la segunda serie de IEE. Se representa la media en los grupos \pm la desviación estándar. D) Igual que C pero respecto a la frecuencia cardíaca.

340 latidos por minuto antes del experimento, durante este y después. Al igual que la temperatura, no hubo diferencias entre GP y GC. Finalmente, durante la toma de los PESP también se registró

el electrocardiograma y, por ello, se calculó la frecuencia cardíaca; como en el registro en carta, no existieron modificaciones significativas en esta variable a lo largo del experimento antes de la

administración del péptido o el vehículo o después.

Cambios en el cociente R2/R1 de la amplitud del PEPS por la administración del péptido BLMP-101

Cada par de estímulos suscitó un par de respuestas PEPS, cada una de las cuales se analizó extrayendo para los cálculos su pendiente promedio de ascenso y su amplitud máxima. Antes de la administración del péptido o el vehículo se encontró plasticidad por pulsos pareados evidentes por cocientes superiores a 1 y que llegaron inclusive hasta 2,5 (figura 3). Como han reportado otras investigaciones, a medida que aumentó el IEE, el cociente disminuyó

paulatinamente [22]. El análisis de los datos entre los grupos no presentó diferencias estadísticamente significativas en ningún IEE, al comparar los grupos en su línea de base ($p > 0,05$). Sin embargo, luego de la administración del tratamiento aparecieron diferencias significativas entre el GP y el GC en los IEE 40 ms ($F_{1,329}=25,453$; $p=0,001$), 60 ms ($F_{1,329}=34,887$; $p=0,001$) y 80 ms ($F_{1,329}=11,4$; $p=0,001$). Los IEE superiores no tuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$). El análisis de medidas repetidas con las pruebas Wilks' Lamda y Roy's Greatest Root, en el que se evaluó el comportamiento en los diferentes IEE, no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$).

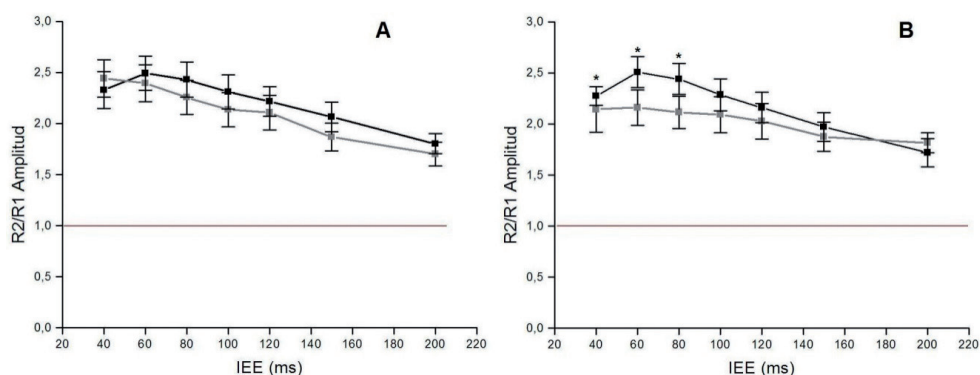


Figura 3. Cambios en el cociente R2/R1 de la amplitud del PEPS por la administración del péptido BLMP-101

A) Las curvas de base representan el comportamiento del cociente R2/R1 promedio \pm el error estándar de la media para la amplitud del PEPS con diferentes intervalos entre estímulo (IEE) para GP (negro) y GC (gris). Este cociente denota la facilitación de la sinapsis con valores mayores que 1 (línea roja), como indicio de que la segunda respuesta fue mayor que la primera. B) Igual que A luego de la administración del tratamiento.

La figura 4 muestra el comportamiento en un registro modelo del GP y GC. Se aprecia el segundo PEPS del par y cómo a medida que aumenta el IEE la respuesta decrece, algo que ocurre tanto en la línea

de base de los dos grupos como en el GC después de la administración del vehículo. Sin embargo, no se observa este mismo comportamiento en el grupo luego de haber administrado el péptido.

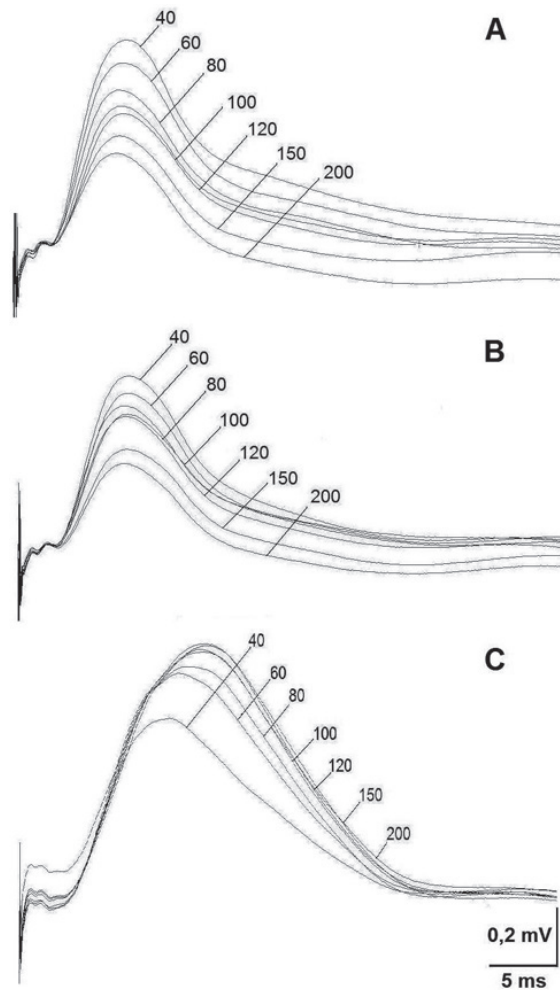


Figura 4. Comportamiento del segundo PEPS con diferentes IEE

Nota. Aparecen los registros del potencial excitador postsináptico de campo (PEPS) en el área CA1 de la rata, desencadenado por el segundo de un par de estímulos (R2) para diferentes intervalos entre estímulos (IEE).

A) Las curvas representan las respuestas en la línea de base para cada uno de los IEE. B) Igual que en A, tras la administración del tratamiento en el GC. C) Igual que en A luego de la administración del tratamiento en el GP.

Cambios en el cociente R2/R1 de la pendiente del PEPS por la administración del péptido BLMP-101

Al igual que con la amplitud, la pendiente del PEPS antes del tratamiento no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo péptido ($p > 0,05$); fue más bien cierto el comportamiento clásico de decaimiento a medida que el IEE fue aumentando (figura 5). Una vez recibido el tratamiento, aparecieron diferencias significativas entre los grupos,

para los IEE 40 ms ($F_{1,329}=21,093$; $p=0,001$) y 60 ms ($F_{1,329}=21,094$; $p=0,001$). Los otros IEE no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$). El análisis de medidas repetidas en el grupo BLMP-101 luego del tratamiento encontró diferencias significativas en la comparación tratamiento vs. línea de base ($F_{1,6}=32,81$; $p=0,0079$). El mismo análisis en el GC no arroja diferencias estadísticamente significativas ($F_{1,6}=3,45$; $p=0,0976$).

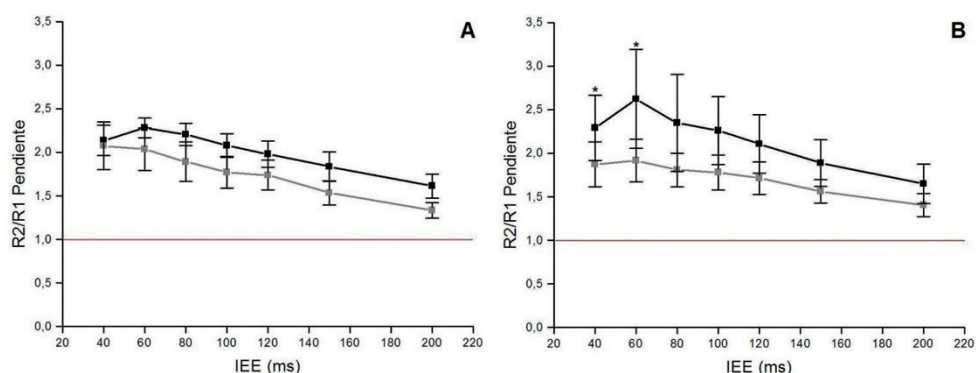


Figura 5. Cambios en el cociente R2/R1 de la pendiente del PEPS por la administración del péptido BLMP-101

A) Las curvas de base representan el comportamiento del cociente R2/R1 de la pendiente del PEPS con diferentes intervalos entre estímulo (IEE) para GP (negro) y GC (gris). Este cociente denota la facilitación de la sinapsis con valores mayores que 1 (línea roja), como indicio de que la segunda respuesta fue mayor que la primera. B) Igual que A, luego de la administración del tratamiento. Los cuadros representan la media de cada grupo y las barras \pm el error estándar de la media.

Cambios en el primer PEPS del par antes y después de la administración del péptido BLMP-101

Un potencial de campo observado cada 10 s nos muestra la respuesta basal de la

sinapsis hipocampal sin ser afectada por la plasticidad del pulso pareado. Utilizando este primer potencial de campo durante todo el experimento, tanto en amplitud como en pendiente, se analizó

el posible cambio luego de la administración del tratamiento; sin embargo, como se aprecia en las figuras 6a a 6d, el comportamiento en valores porcentuales por el tratamiento no produjo cambios significativos tanto en el GP ($F_{1,4}=2,74$; $p=0,1321$) como en el GC

($F_{1,5}=0,85$; $p=0,5738$). Finalmente, las figuras 6d y 6f comparan el PEPS de un IEE determinado contra el mismo IEE después del tratamiento. Al igual que en el análisis anterior no hay diferencias significativas (tanto para la pendiente como para la amplitud).

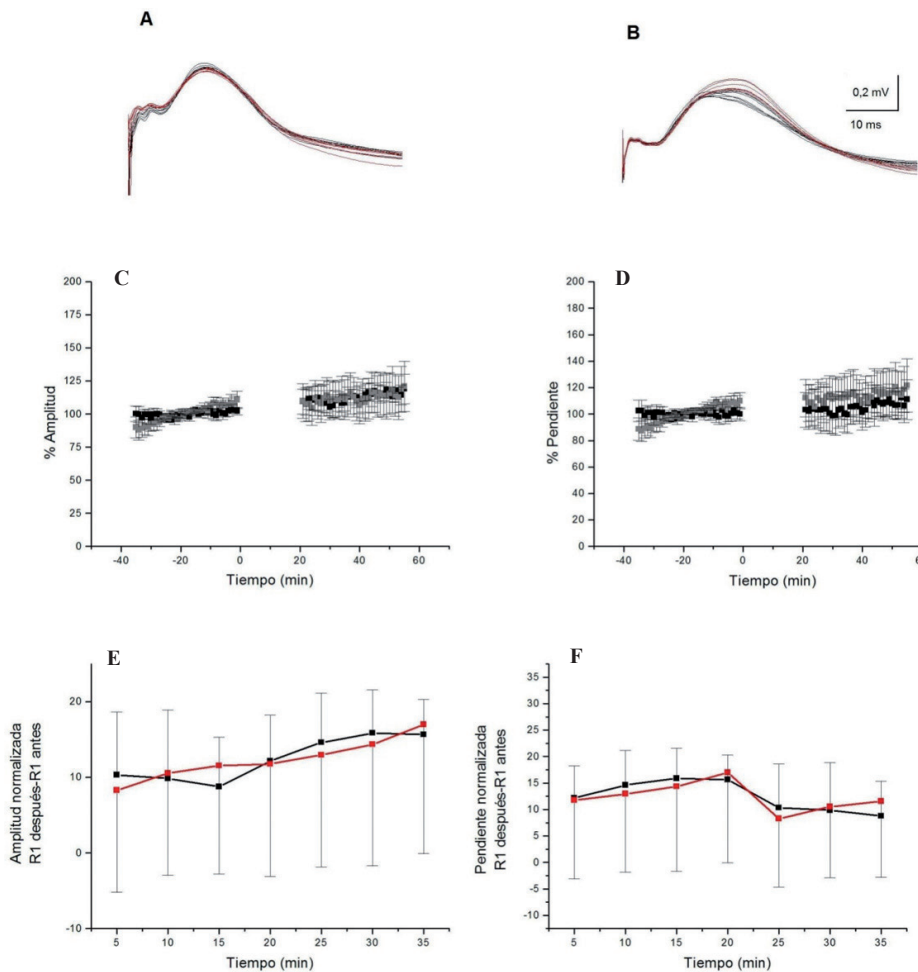


Figura 6. Comportamiento del primero PEPS antes del tratamiento y después

A) Comportamiento de R1 en condiciones basales (negro) y luego del tratamiento (rojo) en GC. B) Igual a A pero en el GP. C y D) Se muestra el porcentaje de amplitud y pendiente de R1 tras la administración del péptido en GP (negro) contra el GC (gris). E y F) Las curvas muestran el porcentaje de cambio en la amplitud y en la pendiente para el GP (negro) y el GC (rojo).

Discusión

Habitualmente, la FPP es evaluada por el cociente entre la amplitud o la pendiente del segundo PEPS sobre el primer PEPS, ambos potenciales de campo obtenidos por la aplicación rápida de un par de estímulos [23,24]. La aparición de FPP se determina cuando el cociente resultado tiene valores superiores a uno; de hecho, valores inferiores podrían delatar la presencia de componentes supresores (específicamente llamados depresión por pulsos pareados) [25].

En los resultados presentados, tanto en GC como en GP se observaron cocientes superiores a uno, incluso llegaron en los dos grupos a valores de 2,5 (figuras 3 y 5). Aunque no existe una diferencia significativa, no deja de ser llamativo el hecho de haber conseguido mayor facilitación de la amplitud que de la pendiente. Por otra parte, y como lo ha descrito la literatura, los resultados de esta investigación muestran que la FPP se afecta, entre otras variables, fundamentalmente por el IEE [22]. Aunque no son presentados aquí, se realizaron registros de IEE que llegaron a aproximadamente 1000 ms, momento en el cual ya no existía FPP.

Lo anterior pone en evidencia que, a medida que aumenta la duración de los intervalos, aparecen menores cocientes de facilitación que incluso llevan a la desaparición de la facilitación sinápti-

ca. Los datos analizados incluyen como intervalo máximo 200 ms, donde todavía existe la facilitación con cocientes promedio de 1,8 para la amplitud y 1,5 para la pendiente. Ello demuestra que la ventana temporal analizada corresponde a un periodo en el que siempre hubo FPP.

Aunque no hay diferencia significativa entre los IEE 40 y 60 ms, resulta llamativo que en contraste con los intervalos mayores (donde va decreciendo el cociente), esta vez el IEE40 resulta menor que el IEE60. Dicho comportamiento fue apreciado tanto en GP como en GC antes del tratamiento y después de este. Aunque hay reportes de este comportamiento bifásico, generalmente se presenta en IEE30 [24-25].

Por desgracia, el montaje experimental no permitió explorar esas pequeñas ventanas temporales, pero se considera importante abordar en un futuro los cambios en IEE menores de 40 ms. La importancia y posibles causas de esta presentación bifásica podrían radicar en el comportamiento dinámico de los elementos presinápticos, y aun cuando lo anterior se explica por diversas aproximaciones, es la teoría del calcio residual la que tiene mayor sustentación experimental [23,26].

Desde esta visión, una vez se activa la terminal presináptica y todos los fenómenos de señalización celular que

conducen a la liberación del neurotransmisor, las concentraciones de calcio comenzarán a disminuir hasta que la terminal axonal sea aclarada totalmente. Existen varios mecanismos de aclaramiento del calcio presináptico que tienen diferentes tiempos y cinéticas de operación. Dentro de los más rápidos y de aparición más temprana están los mecanismos de amortiguamiento en la terminal presináptica, con tasas máximas de acción alrededor del primer milisegundo después de la activación; sin embargo, sus efectos pueden inclusive llegar hasta los 600 ms [27]. Los mecanismos de transporte activo primario, por su parte, tienen puntos máximos de acción a los 10 ms, pero sus efectos pueden llegar hasta los 30 ms. En última instancia, aparecen componentes tardíos con dinámicas comparativamente más lentas dentro de los que se encuentra la actividad mitocondrial.

Puestos sincrónicamente estos y otros mecanismos de aclaramiento, explican la variabilidad en la respuesta dependiendo del IEE. Además, se ha determinado que el calcio residual (el remanente de la primera activación) que se encuentra en la terminal cuando llega el segundo estímulo durante la FPP, explica el aumento característico en la respuesta del segundo PEPS. Es claro que entre mayor sea el tiempo que pase entre el primer y segundo estímulo, los mecanismos de aclaramiento tendrán mayor tiempo de cumplir su

acción y por ello la facilitación cada vez será menor.

Ahora bien, los efectos que pueda tener un agonista glutamatérgico sobre la FPP estarán dirigidos fundamentalmente a los componentes presinápticos, como ha sido demostrado por investigaciones previas [28]. Los resultados de la presente investigación podrían corroborar dichas aproximaciones, aún más a sabiendas de recientes hallazgos sobre la disposición presináptica de RNMDA [29]. Incluso se ha puesto en evidencia que estos receptores están conformados por la subunidad que sería blanco de la conotoxina: la subunidad NR2B [30-34].

Aunque una posible explicación al efecto plástico del péptido evidente en los IEE más cortos podría estar basada en el mecanismo clásico de funcionamiento de corrientes de calcio, gracias a los hallazgos más recientes, también podría esperarse la presencia de corrientes catiónicas despolarizantes de sodio [30]. Estas últimas también podrían por sí mismas llevar a cambios presinápticos de calcio y con ello la liberación de más neurotransmisor.

Efectivamente, los resultados presentados aquí demuestran que existe un efecto incipiente para la FPP cuando los IEE son menores a 80 ms (en el caso de la amplitud) o menores a 60 ms (en el caso de la pendiente). Así, aunque aparecen efectos del péptido BLMP-

101, estos son altamente dependientes del intervalo, siendo nulos en intervalos mayores a 100 ms. Lo anterior está en consonancia con la teoría del calcio residual, en cuanto se ve potenciado por el efecto que pueden tener los mecanismos de aclaramiento.

Por otra parte, no parecen existir efectos en la postsinapsis, ya que la actividad basal observada a través de los PEPS no parece haber aumentado a lo largo del tiempo, caso en el cual se sospecharía el efecto sobre RNMDA convencionales. Por supuesto, es posible que la dosis administrada desempeñe un papel importante en la actividad post-sináptica, ya que en los experimentos se utilizó una única dosis. Dicha dosis correspondió a la usada en investigaciones anteriores y que han evidenciado cambios comportamentales en el aprendizaje de ratas. Sin embargo, en las condiciones de nuestro modelo es necesario considerar que la dosis administrada fue baja, que su paso a través de la barrera hematoencefálica estuvo restringido o que sufrió procesos de biotransformación que lo inactivaron.

Adicionalmente, es claro que hemos evaluado una región puntual en un circuito específico y, tal vez por ello, los efectos sean incipientes. Sin embargo, en conjunto y una vez ensamblado este circuito a otros posiblemente involucrados, la respuesta podría amplificarse. De esta manera, si se quieren ver

efectos conspicuos sobre el circuito CA3-CA1, parece necesario aplicar un protocolo que involucre diferentes concentraciones a la utilizada para esta investigación.

Un hallazgo que debe destacarse para aplicaciones futuras es la ausencia de efectos sistémicos en variables vitales, como la frecuencia cardíaca y la temperatura, y descartar así efectos adversos en estos sistemas y demostrar, en parte, la alta especificidad del péptido BLMP-101 sobre componentes cerebrales, particularmente hipocampales.

Con todo lo anterior, se considera necesario evaluar las respuestas electrofisiológicas con dosis mayores del péptido en las cuales se pueda determinar si la divergencia en los valores de FPP es dosis-dependiente; determinar el grado de afinidad del péptido por la región estudiada (CA1), específicamente su alta afinidad por la subunidad NR2B del RNMDA, por medio de técnicas inmunohistoquímicas, y, finalmente, llevar a cabo un estudio farmacológico del péptido para caracterizarlo cinética y dinámicamente. Esto último, teniendo en cuenta que es posible que los efectos sean resultado de metabolitos producto de la degradación del péptido.

Conclusiones

Los resultados presentados por este trabajo evidencian la importancia del

diseño y de la caracterización de moléculas bioinspiradas (en este caso en toxinas biológicas), para el desarrollo de posibles alternativas terapéuticas de procesos como las enfermedades de Alzheimer o de Parkinson [35-38]. Como hechos puntuales se pudo demostrar el efecto del péptido en la FPP, tanto para la amplitud como para la pendiente en particular para los IEE más pequeños (40, 60 y 80 ms para la amplitud; 40 y 60 ms para la pendiente). Se sugieren como responsables de esta dinámica el papel de los mecanismos de aclaramiento presináptico del calcio.

Finalmente, y con miras a futuras investigaciones, se demostró que en las dosis utilizadas el péptido no tiene efecto en variables sistémicas como la frecuencia cardíaca y la temperatura.

In memoriam

La investigación presentada fue originada en los trabajos del doctor Leonardo René Lareo, quien acompañó el proceso en todas sus fases y quien guardó un profundo entusiasmo por el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas bioinspiradas. Infortunadamente, este científico, maestro y compañero falleció sin poder ver terminada su obra, que continuará en el legado de los que aprendimos con él que la amabilidad y la calidez no chocan con la disciplina que guarda la ciencia. A él todos los derechos de su obra.

Agradecimientos

El autor manifiesta su agradecimiento a las unidades de Fisiología de las universidades a las que se encontraba vinculado durante el desarrollo de la investigación: Universidad Nacional de Colombia, Universidad Militar Nueva Granada y Pontificia Universidad Javeriana. Allí, profesores, compañeros y amigos (doctores Miguel Martínez, Alejandro Múnera, Juan Miguel Estrada, Esperanza Holguín y Armando Sánchez) aportaron tiempos, conocimientos y recursos, sin los cuales no habría podido llevarse a cabo el presente trabajo.

Así mismo, un reconocimiento al Instituto Nacional de Salud, el cual, a través del doctor Leonardo Lareo, sintetizó el péptido necesario para culminar el trabajo.

A André Riveros, quien participó en el diseño, montaje y revisión del trabajo, con sus observaciones y comentarios agudos que fortalecieron cada fase del proceso.

Al Departamento de Patología, dirigido en su momento por la doctora Ana María Uribe, quien facilitó los equipos necesarios para las técnicas histológicas.

Finalmente, a los señores Jesús Chaparro y Leonor Farfán, auxiliares del Departamento de Ciencias Fisiológicas y el Laboratorio de Cirugía Experimental, quienes siempre diligentes y dis-

puestos facilitaron los escenarios para esta investigación.

Referencias

1. Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*. 1999;401:63-9.
2. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesth Analg*. 2003;97:1108-16.
3. South SM, Kohno T, Kaspar BK, Hegarty D, Vissel B, Drake CT et al. A conditional deletion of the NR1 subunit of the NMDA receptor in adult spinal cord dorsal horn reduces NMDA currents and injury-induced pain. *J Neurosci*. 2003;23:5031-40.
4. Inturrisi CE. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain and morphine tolerance. *Minerva Anesthesiol*. 2005;71:401-3.
5. Hingne PM, Sluka KA. Blockade of NMDA receptors prevents analgesic tolerance to repeated transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) in rats. *J Pain*. 2008;9:217-25.
6. Nazarian A, Gu G, Gracias NG, Wilkinson K, Hua XY, Vasko MR et al. Spinal N-methyl-D-aspartate receptors and nociception-evoked release of primary afferent substance P. *Neuroscience*. 2008;152:119-27.
7. Tandon OP, Mehta AK, Halder S, Khanna N, Sharma KK. Peripheral interaction of opioid and NMDA receptors in inflammatory pain in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2010;54:21-31.
8. Alexander JK, DeVries AC, Kigerl KA, Dahlman JM, Popovich PG. Stress exacerbates neuropathic pain via glucocorticoid and NMDA receptor activation. *Brain Behav Immun*. 2009;23:851-60.
9. Jung YH, Suh YH. Differential functions of NR2A and NR2B in short-term and long-term memory in rats. *Neuroreport*. 2010;21:808-11.
10. Wang D, Cui Z, Zeng Q, Kuang H, Wang LP, Tsien JZ et al. Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS One*. 2009;4:e7486.
11. von EJ, Doganci B, Jensen V, Hvalby O, Gongrich C, Taylor A et al. Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron*. 2008;60:846-60.
12. Hu M, Sun YJ, Zhou QG, Chen L, Hu Y, Luo CX et al. Negative regulation of neurogenesis and spatial memory by NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurochem*. 2008;106:1900-13.
13. Jiao J, Nakajima A, Janssen WG, Bindokas VP, Xiong X, Morrison JH et al. Expression of NR2B in cerebellar granule cells specifically facilitates effect of motor training on motor learning. *PLoS One*. 2008;3:e1684.
14. Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B et al. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci*. 2007;25:1815-22.
15. Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH et al. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*. 2005;47:859-72.
16. Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation,

- and clinical implications. *Pharmacol Ther.* 2003;97:55-85.
17. Oyuela R, Lareo L, Muñoz L, Morales L, Echeverry S, Uribe A et al. Efecto en el aprendizaje y la memoria espacial de un péptido sintético en ratas: estudio preliminar. *Psicología desde el Caribe.* 2004;13:1-14.
 18. Tzingounis AV, Nicoll RA. Presynaptic NMDA receptors get into the act. *Nat Neurosci.* 2004;7:419-20.
 19. Mukhamedyarov MA, Zefirov AL, Palotas A. Paired-pulse facilitation of transmitter release at different levels of extracellular calcium concentration. *Neurochem Res.* 2006;31:1055-58.
 20. Craig S, Commins S. Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the projection from hippocampal area CA1 to the entorhinal cortex. *Neurosci Res.* 2005;53:140-6.
 21. Riveros A. Registros in vivo de la facilitación por pulsos pareados y la potenciación a largo plazo en la región CA1 de la rata: descripción y prueba de una técnica para la evaluación de la plasticidad sináptica. *Revista MED.* 2005;13:75-85.
 22. Akopian G, Walsh JP. Corticostriatal paired-pulse potentiation produced by voltage-dependent activation of NMDA receptors and L-type Ca(2+) channels. *J Neurophysiol.* 2002;87:157-65.
 23. Mukhamedyarov MA, Grishin SN, Zefirov AL, Palotas A. The mechanisms of multi-component paired-pulse facilitation of neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction. *Pflugers Arch.* 2009;458:563-70.
 24. Kim J, Alger BE. Random response fluctuations lead to spurious paired-pulse facilitation. *J Neurosci.* 2001;21:9608-18.
 25. Leung LS, Peloquin P, Canning KJ. Paired-pulse depression of excitatory postsynaptic current sinks in hippocampal CA1 in vivo. *Hippocampus.* 2008;18:1008-20.
 26. Scullin CS, Wilson MC, Partridge LD. Developmental changes in presynaptic Ca(2+) clearance kinetics and synaptic plasticity in mouse Schaffer collateral terminals. *Eur J Neurosci.* 2010;31:817-26.
 27. Rusakov DA. Ca2+-dependent mechanisms of presynaptic control at central synapses. *Neuroscientist.* 2006;12:317-26.
 28. Catterall WA, Few AP. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron.* 2008;59:882-901.
 29. Luccini E, Musante V, Neri E, Raiteri M, Pittaluga A. N-methyl-D-aspartate auto-receptors respond to low and high agonist concentrations by facilitating, respectively, exocytosis and carrier-mediated release of glutamate in rat hippocampus. *J Neurosci Res.* 2007;85:3657-65.
 30. Bardoni R, Torsney C, Tong CK, Prandini M, MacDermott AB. Presynaptic NMDA receptors modulate glutamate release from primary sensory neurons in rat spinal cord dorsal horn. *J Neurosci.* 2004;24:2774-81.
 31. Duguid IC, Smart TG. Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nat Neurosci.* 2004;7:525-33.
 32. Tzingounis AV, Nicoll RA. Presynaptic NMDA receptors get into the act. *Nat Neurosci.* 2004;7:419-20.
 33. Buonanno A. Presynaptic NMDA receptors also make the switch. *Nat Neurosci.* 2011;14:274-6.
 34. McGuinness L, Taylor C, Taylor RD, Yau C, Langenhan T, Hart ML et al. Presynap-

- tic NMDARs in the hippocampus facilitate transmitter release at theta frequency. *Neuron*. 2010;68:1109-27.
35. Decker H, Jurgensen S, Adrover MF, Brito-Moreira J, Bomfim TR, Klein WL et al. N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid-beta peptide oligomers. *J Neurochem*. 2010;115:1520-9.
 36. Kurup P, Zhang Y, Xu J, Venkitaramani DV, Haroutunian V, Greengard P et al. Abeta-mediated NMDA receptor endocytosis in Alzheimer's disease involves ubiquitination of the tyrosine phosphatase STEP61. *J Neurosci*. 2010;30:5948-57.
 37. Cranwell-Bruce LA. Drugs for Alzheimer's disease. *Medsurg Nurs*. 2010;19:51-3.
 38. Koutsilieri E, Riederer P. Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007;13 Suppl 3:S329-S331.

Correspondencia

Alain Riveros Rivera
 Departamento de Ciencias
 Fisiológicas
 Ed. 31, Barrientos Conto
 Pontificia Universidad Javeriana
 Bogotá, Colombia
riveros-a@javeriana.edu.co
alain.riveros@unimilitar.edu.co