

11281

33

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOMEDICAS PRESENTA:**

Manuel Sánchez Alavez

**EFECTOS DE LA ADMINISTRACION INTRACEREBROVENTRICULAR
DE LA gp120 DERIVADA DEL VIH Y DEL VIF EN LA ADQUISICION DE
DIFERENTES TAREAS DE APRENDIZAJE, ACTIVIDAD
ELECTROFISIOLOGICA DEL HIPOCAMPO Y LOS ESTADOS DE
ALERTA DE LA RATA ADULTA**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Oscar Prospéro García

México D. F., Enero 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
SUMMARY	1
RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
1.1 INFECCION AGUDA	6
1.1.1. DIAGNOSTICO DE SEROPOSITIVIDAD	8
1.1.2. WESTERN BLOT	8
1.2 PERIODO ASINTOMATICO	9
1.3 SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA)	10
1.4 MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS ASOCIADAS A LA INFECCION CON EL VIRUS DE LA INMUNO- DEFICIENCIA HUMANA	12
1.4.1 CRITERIOS PARA EL DIAGNOSTICO PROBABLE DE DEMENCIA ASOCIADA A LA INFECCION CON EL VIH	13
1.4.2 CICLO SUEÑO-VIGILIA	16
1.4.3 POTENCIALES PROVOCADOS	16
1.5 ALTERACIONES MORFOLOGICAS	17
1.6 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA E INFECCION CELULAR	19
1.7 PROBABLE PAPEL DEL VIRUS EN LA DAV	22
1.8 gp120 Y DAÑO NEURONAL	23
1.9 PROBABLE PAPEL DE LOS RECEPTORES A LAS CITOCINAS EN LA PRODUCCION DE LA DAV	27
2.1 JUSTIFICACION	30
2.2 OBJETIVOS	31
2.3 HIPOTESIS	31
2.4 METODOS	32
2.4.1 ESTUDIOS PILOTO PARA DETERMINAR LA CURVA DOSIS- RESPUESTA DE LA gp120 SOBRE LA CONDUCTA EN LA PRUEBA DE PREVENCION PASIVA	32

PRUEBA DE PREVENCION PASIVA	33
RESULTADOS	35
2.4.2 METODO GENERAL EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES	42
2.4.3 TRATAMIENTO CON VIH-gp120 O VIF-gp120	42
2.4.4 LABERINTO CIRCULAR DE BARNES	43
2.4.5 PÔTENCIACION DE LARGO PLAZO	47
2.4.6 ENSAYO BIOQUIMICO PARA LA DETECCION DE AMP CICLICO EN HIPOCAMPO	50
2.4.7 ESTUDIO DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA	51
2.4.8 ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTANEA	53
2.4.9 PRUEBA DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y EQUILIBRIO	53
2.4.10 ANALISIS ESTADISTICO	54
2.4.11 HISTOLOGIAS	55
3 RESULTADOS	
3.1 LA gp120 DERIVADA DEL VIH Y DEL VIF CAUSA UN DETERIORO EN LA ADQUISICION DE LA MEMORIA ESPACIAL	56
3.2 LA LTP ES DETERIORADA POR LA gp120	62
3.3 LA PRODUCCION DE AMP _c ESTA DETERIORADA EN EL GRUPO TRATADO CON VIH-gp120	70
3.4 EL CICLO SUEÑO-VIGILIA ESTA ALTERADO POR LA ADMINISTRACION TANTO DE LA VIF-GP120 COMO DE LA VIH-gp120	72
3.5 LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTANEA Y LA EJECUCION EN LA VIGA DE DRUCKER ESTA DETERIORADA EN LOS GRUPOS TRATADOS CON LA gp120 DERIVADA DEL VIF Y DEL VIH	76
3.6 HISTOLOGIAS	80
3.7 DISCUSION	82
3.8 CONCLUSIONES	93
REFERENCIAS	96

SUMMARY

The HIV-associated dementia (HAD) has been determined in 20-30% of patients suffering from Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Due to the fact that neurons are not directly infected with human Immunodeficiency virus (HIV), the pathophysiological manifestations of HAD could be mediated through an indirect mechanism. The envelope glycoprotein 120 (gp120) derived from HIV seems to play a critical role in the pathophysiology of neuropsychiatric abnormalities in humans. Likewise, in the cat model, the infection with the feline immunodeficiency virus (FIV) or the treatment with FIV-derived gp120, produce neurological and behavioral abnormalities. Also, a number of experiments have shown that nanomolar concentration of HIV-gp120 causes neuronal death in vivo, and a picomolar concentration kills neurons in vitro.

The goal of the present study was to determine the effect of both, HIV- or FIV-gp120, on learning and memory processing, hippocampal long-term potentiation (LTP), locomotor activity, hippocampal cAMP production and on the sleep-waking cycle in rats.

Spatial memory was impaired in those rats treated with FIV- and HIV-gp120. Due to the fact that the hippocampus is implicated in the modulation of this type of memory, we evaluated long-term potentiation (LTP) in HIV-gp120 and FIV-gp120 pretreated groups. Both groups showed a significant decrease in post-tetanic potentiation but only HIV-gp120 group deteriorated LTP expression. Also, HIV-gp120 diminished cAMP production in the hippocampus. Electroencephalographic studies (EEG) show that wakefulness (W) increases during the light period and decreases during the dark period in both, FIV- and HIV-gp120 pretreated groups. Likewise, slow wave sleep stage 1 (SWS1) has a significant increase throughout the 24 h of recording in HIV-gp120 group, while FIV-gp120 group showed the same effect at 13:00, 21:00 and 01:00 hours only. Slow wave sleep stage 2 (SWS2) decreased at 13:00, 17:00, 05:00 and 09:00 hours in both gp120 pretreated groups, but FIV showed a similar effect at 01:00. Rapid eye movement (REM) sleep decreased significantly at 13:00 in both groups. Finally, motor activity was impaired in FIV- and HIV-gp120 pretreated groups.

These results show that either, HIV-gp120 or FIV-gp120, are capable of inducing alterations in memory processes, hippocampal LTP and in the level of alertness as assessed by the evaluation of the sleep-waking cycle. All these abnormalities suggest that HIV-gp120 causes neurophysiological abnormalities and facilitates HAD development in AIDS patients.

RESUMEN

La demencia asociada a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), DAV, ha sido reportada en un 20-30% de pacientes que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Debido a que las neuronas no se infectan directamente con el VIH, las manifestaciones fisiopatológicas del DAV podrían estar mediadas a través de un mecanismo indirecto. La glicoproteína 120 (gp120), que forma parte de la envoltura viral del VIH, parece jugar un papel importante en la fisiopatología de las anormalidades neuropsiquiátricas observada en humanos. Del mismo modo, la infección con el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) o el tratamiento con FIV-gp120, causa anormalidades conductuales y neurológicas en gatos. Muchos experimentos han mostrado que concentraciones nanomolares de VIH-gp120 causa muerte neuronal *in vivo*, y concentraciones picomolares mata neuronas *in vitro*.

El propósito del presente trabajo fue determinar los efectos de las gp120 derivadas del VIF y del VIH en diferentes tipos de aprendizaje, actividad electrofisiológica del hipocampo, actividad locomotora, así como la producción de AMPc en el hipocampo de ratas adultas, y también el ciclo sueño-vigilia.

Los resultados indican que las ratas pretratadas con VIF-gp120 o VIH-gp120 tienen un deterioro en la memoria espacial. Debido a que el hipocampo está involucrado en la modulación de este tipo de memoria, evaluamos la potenciación de largo plazo (LTP) en otros grupos pretratados con gp120 derivado del VIF y del VIH. Ambos grupos presentaron una disminución significativa de la potenciación postetánica, pero solo el grupo tratado con VIH-gp120 mostró un deterioro significativo del mantenimiento de la LTP. Del mismo modo, al evaluar la producción de AMPc en el hipocampo, esta se encontró disminuida en el grupo tratado con VIH-gp120.

Por otra parte, la actividad motora se deterioró en los grupos tratados con ambas gp120, y además, los estudios del electroencefalograma indicaron que el estado de vigilia se incrementó en el periodo de luz en ambos grupos (VIF- y VIH-gp120), pero esta misma vigilia disminuyó durante el periodo de oscuridad. Del mismo modo, el sueño de ondas lentas 1 (SOL1) aumentó a lo largo de las 24 h en el grupo VIH-gp120, mientras que el grupo VIF-gp120 presentó el mismo efecto a las 13:00, 21:00 y 01:00 horas. El sueño de ondas lentas 2 (SOL2) disminuyó a las 13:00, 17:00, 05:00 y 09:00 horas en ambos grupos, pero VIF-gp120 presentó disminución adicional a las 01:00 h. El sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) presentó una disminución significativa a las 13:00 en ambos grupos. Finalmente, la actividad locomotora se deterioró en los grupos tratados con VIF- o VIH-gp120. Estos resultados muestran que tanto la gp120 derivada del VIH como la del VIF son capaces de inducir alteraciones neurofisiológicas que contribuyen a explicar la patología de la DAV.

INTRODUCCION

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un padecimiento infecto-contagioso provocado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Esta enfermedad está caracterizada por un conjunto de signos y síntomas que reflejan la depresión de la inmunidad celular y humoral, seguida de la aparición de infecciones oportunistas, desarrollo de cáncer y, en algunos pacientes, la aparición de alteraciones cognitivas (Greene, 1991; Newman y cols., 1995). De acuerdo a la definición de Centros de Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Preventions) de Estados Unidos, el diagnóstico de infección por el VIH, así como del SIDA se realiza cuando una persona reúne los siguientes criterios (CDC, 1993)

En adultos, adolescentes o niños mayores o iguales de 18 meses, un caso de infección por el VIH que debe ser reportado, debe de incluir los siguientes criterios:

- 2) Resultado positivo en una prueba de detección de anticuerpos contra el VIH (e.g. Inmunoensayo ligado a enzima (LIA) positivo) seguido de una prueba confirmatoria positiva (e.g. Western blot o prueba inmunofluorescente con anticuerpos),
ó
- 3) resultado o reporte positivo de alguno de los siguientes pruebas virales: Detección de DNA o RNA virales usando prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ó prueba para la detección del antígeno p24, incluyendo un ensayo de neutralización, aislamiento del virus (cultivo viral),
ó
- 4) criterio clínico (si los criterios de laboratorio arriba mencionados no son encontrados),
ó
- 5) condiciones donde el criterio es basado en la definición de casos de SIDA de la CDC.

En niños menores de 18 meses, un caso reportable de infección por el VIH debe incluir por lo menos uno de los siguientes criterios:

- 1) Criterio de laboratorio para el diagnóstico definitivo:
 - Resultado positivo en dos pruebas separadas (excluyendo la sangre del cordón umbilical), usando uno o mas de los siguientes pruebas:
 - Detección de RNA o DNA virales
 - Prueba para la detección de la p24, incluyendo prueba de neutralización, en un infante mayor o igual de un mes de edad.
 - Aislamiento del VIH (cultivo viral)
ó
- 2) Diagnóstico presuntivo en un infante que no presenta los criterios para el diagnóstico definitivo de infección con el VIH pero que presenta:

-Resultado positivo en una muestra (excluyendo el cordón umbilical) usando las pruebas virológicas antes mencionadas y que no tenga pruebas subsecuentes negativas por virología o prueba por anticuerpos.

ó

- 3) Criterio clínico u otro (si los criterios definitivos o presuntivos no cumplen los requisitos).
-Diagnóstico de infección por el VIH, basado en los criterios arriba mencionados que es documentada en un registro clínico por un médico.

ó

- 4) Condiciones que cumplen con los criterios manejados en definición de casos de SIDA en el monitoreo incluido en la edición de 1987.

El diagnóstico de SIDA se realiza, cuando una persona está infectada con el VIH (ver criterios anteriores) y que presente inmunodepresión severa (conteo de linfocitos T CD4+ < 200 μ L, o porcentaje de concentración de linfocitos T CD4+ con respecto a linfocitos totales < 14), tuberculosis pulmonar, neumonía recurrente o cáncer cervical invasivo (CDC, 1987 y 1993).

Para su estudio clínico, la infección por el VIH se ha dividido en tres etapas: la infección aguda, el periodo asintomático y el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. En la figura 1 se presenta la relación temporal de los tres periodos clínicos reportados en pacientes infectados con el VIH con base a los niveles de linfocitos CD4+ en sangre, los niveles de RNA viral en plasma y la respuesta inmune.

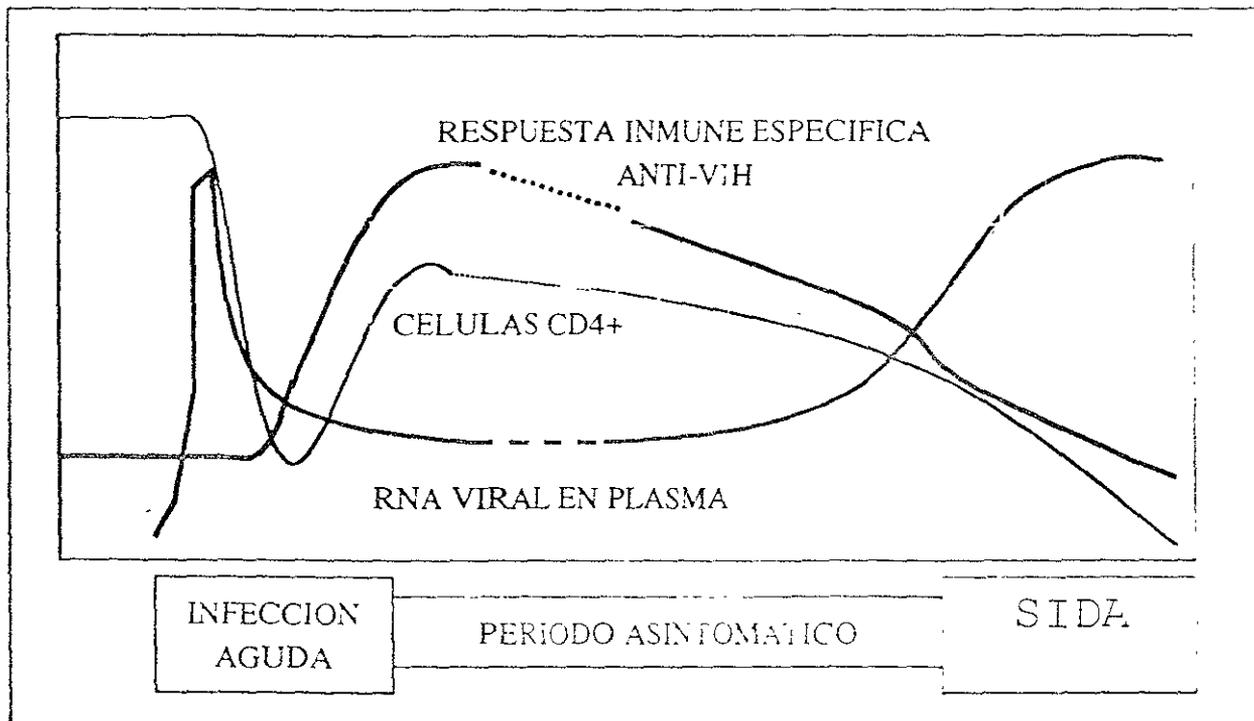


FIGURA 1: En esta figura se representa la secuencia clínica observada en pacientes infectados con el VIH. En este caso, ilustramos el curso de la enfermedad en relación a los niveles de los linfocitos CD4+ en sangre (curva con línea delgada), los niveles de RNA viral en plasma (curva con línea gruesa clara) y la respuesta inmune específica anti-VIH (curva con línea gruesa oscura). Debajo de la gráfica representamos el periodo de la infección aguda, el asintomático y del SIDA. Durante la infección aguda, la entrada y replicación del VIH va seguida de un aumento de los niveles de RNA viral en plasma, seguido a su vez, de una disminución del conteo de células CD4+. Después de un periodo breve se activa la respuesta inmune específica seguida también con el aumento de las células CD4+, lo que induce una disminución de los niveles de RNA viral en plasma, dando paso al periodo latente o asintomático, el cual es variable en duración. Nuevamente, el aumento de la carga viral produce una disminución de la respuesta inmune, lo que aumenta la predisposición a infecciones oportunistas y deterioro del paciente. Esto da paso a la última etapa de la infección o SIDA, seguida de la muerte del paciente.

Es importante señalar que el CDC hace una clasificación mas extensa de la enfermedad y establece cuatro grupos para su estudio, pero para fines prácticos de esta tesis manejaremos el esquema de la figura 1. En la siguiente tabla (tabla 1) mostramos la clasificación propuesta por el CDC (1987).

Tabla 1: Clasificación de la infección por el VIH

Grupo	Clasificación
Grupo I	Infección aguda
Grupo II	Infección asintomática
Grupo III	Linfadenopatía generalizada
Grupo IV	Otra condición
Subgrupo A	Enfermedad constitucional
Subgrupo B	Enfermedad neurológica
Subgrupo C	Enfermedades infecciosas secundarias
Categoría C-1	Enfermedades infecciosas secundarias especificadas en el CDC para el SIDA
Categoría C-2	Otras enfermedades infecciosas secundarias
Subgrupo D	Cáncer secundario
Subgrupo E	Otras condiciones

CDC= Centers for Disease Control and Prevention. Nota: Los pacientes incluidos en el grupo II y III pueden ser subclasificados con base a estudios de laboratorio. Los pacientes del subgrupo D deben de tener la definición de SIDA de acuerdo a la CDC. (Tomado del CDC, Revision of the CDC Surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1987)

A continuación haremos una descripción de los tres períodos clínicos de la enfermedad, así como sus principales características clínicas y de laboratorio.

1.1 INFECCION AGUDA

La infección primaria con el VIH, también conocida como síndrome retroviral, puede producir una enfermedad moderada y autolimitante en un 50 a 90% de personas infectadas. El tiempo que transcurre desde la infección de la mucosa hasta detectar la viremia es alrededor de 4 a 11 días, aunque este periodo es mas corto cuando el virus entra en contacto directo con células sanguíneas. El tiempo que pasa desde la exposición hasta la manifestación de los síntomas clínicos es de 2 a 6 semanas, y estos pueden persistir por una a dos semanas (Quinn, 1998; Kahn y Walker, 1998).

La infección se adquiere comúnmente por contacto sexual con personas infectadas, uso de agujas y jeringas contaminadas con el VIH, contacto con sangre contaminada con el virus (comúnmente transfusión), así como durante el embarazo, el parto (a través del contacto de la sangre materna y fetal), y en forma menos común en la alimentación materna (Blocker y Cohen, 2000; Ickovics y cols, 2000).

Clínicamente la infección aguda se parece a la mononucleosis infecciosa o al resfriado común. Los síntomas típicos son fiebre, cefalea, fatiga, dolor al tragar los alimentos, mialgias, artralgias, así como erupción maculopapular en la piel en forma generalizada y transitoria. En algunas ocasiones se observa candidiasis oral, así como dolor abdominal leve. Algunos pacientes desarrollan linfadenopatía cervical o axilar, y por lo general esto sucede en la segunda semana de la infección (Lang y cols, 1989; Baltimore y Feinberg, 1989).

También es frecuente encontrar linfopenia y/o trombocitopenia. En ésta etapa, los niveles de las células CD4 disminuyen transitoriamente y se elevan nuevamente después de la infección aguda, marcando el inicio de la fase asintomática. En esta etapa asintomática, los niveles de células CD4 nuevamente empiezan a disminuir paulatinamente hasta dar inicio a la fase clínica del SIDA (ver más adelante). Por otra parte, durante la infección aguda, las células CD8 (citotóxicas) aumentan sus niveles y se mantienen elevados hasta que los síntomas de la infección aguda desaparecen y la viremia disminuye (Kahn y Walker, 1998).

Durante la fase aguda, hay una replicación viral activa, produciéndose un alto número de nuevos viriones. La viremia es de por lo menos 50,000 copias de RNA viral/mL, pero frecuentemente está en el rango de 1,000,000 a 10,000,000 copias. Durante la fase de viremia, el aumento considerable de la carga viral es un factor potencial para la diseminación de la infección a otras

personas, ya que estadísticamente se ha reportado que el 50% de las infecciones se adquieren por contacto con personas con viremia (Quinn, 1997).

1.1.1. DIAGNOSTICO DE SEROPOSITIVIDAD

La detección de la infección con el VIH se realiza comunmente empleando la técnica de ELISA o EIA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). Entre otras pruebas que se pueden utilizar para realizar el diagnóstico podemos mencionar el Inmunoblot, el ensayo de aglutinación de partículas, ensayo inmunofluorescente, ensayo para detección de IgA en recién nacidos de madres infectadas con VIH e hibridación in situ. En general, estas pruebas detectan anticuerpos tanto para VIH 1 como para VIH 2. El examen de confirmación mas empleado es el Western blot (Sloand y cols., 1991). Brevemente, la prueba de ELISA es un estudio de laboratorio que consiste en un medio donde se encuentran los antígenos inactivados del VIH. Se incuba con el suero del paciente. Si el paciente se encuentra infectado, su suero tendrá anticuerpos dirigidos contra las proteínas virales, y por lo tanto se unirán a los antígenos en el soporte. Posterior a esto se agrega una anti-inmunoglobulina humana (o segundo anticuerpo que tiene al mismo tiempo una enzima unida) que se unirá a los anticuerpos anti-VIH del paciente capturados en la placa. El siguiente paso es agregar un substrato que cambia de color por acción de la enzima unida al segundo anticuerpo. El cambio de color indicará la presencia de anticuerpos virales y la prueba será positiva (Sloand y cols., 1991).

1.1.2. WESTERN BLOT

El Western blot (WB) es una prueba para confirmar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus. En este método se separan las proteínas que constituyen al virión de acuerdo a su peso molecular utilizando una electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual es incubada en presencia del suero del

paciente, y si hay anticuerpos, estos se pegarán a los antígenos virales. Las bandas reconocidas por los anticuerpos son visualizadas por una reacción enzimática colorida utilizando anticuerpos anti-inmunoglobulinas (llamados también segundo anticuerpo o conjugado) que están acoplados a una enzima como la fosfatasa alcalina. Finalmente, se agrega un sustrato que se precipita cuando reacciona con el conjugado resultando en una banda visible donde el anticuerpo primario se unió a la proteína o antígeno (O'Gormany cols., 1991).

1.2 PERIODO ASINTOMÁTICO

Después de que la infección aguda termina, el proceso infeccioso continúa y cursa por una fase llamada latente o asintomática. El periodo de esta fase puede ser variable y va desde 18 meses hasta 15 años. El promedio se encuentra en 8 a 10 años (Pantaleo y cols., 1993).

~~Durante esta fase, hay replicación viral continua, aunque en ocasiones esta no puede ser detectada en células mononucleares de sangre periférica. A su vez, la cantidad de células CD4 disminuyen continuamente hasta que la respuesta inmune es insuficiente para contener la replicación viral (Greene, 1991; Tenner-Racz y cols., 1998).~~

La duración del periodo asintomático depende de las condiciones particulares del huésped y del virus: Entre los factores del huésped se encuentran la capacidad de su sistema inmune para controlar la infección, su estado nutricional, y en tanto que entre los factores del virus están las características de la cepa viral, su tasa de replicación y mutación principalmente (Lang y cols., 1989; Pantaleo y cols., 1993, Chaisson y cols 1998).

En esta fase, la prueba para la detección de anticuerpos contra el VIH es positiva, aunque usualmente la prueba para la detección de p24 suele ser negativa (Tenner-Racz y cols., 1998). El cultivo de virus se hace a partir de las células mononucleares de sangre periférica (Burgard y cols., 2000) a pesar de la viremia disminuida en sangre periférica.

En la fase latente, empieza a haber una pérdida de la arquitectura de los nódulos linfáticos acompañado del deterioro del sistema inmune, presentándose una disminución marcada en el cuenta de linfocitos CD4 y un incremento importante de la viremia. Es en esta fase donde aparece la linfadenopatía generalizada persistente (LGP) (Burgard y cols., 2000; Levy, 1993).

1.3 SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA):

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida es el estado clínico final de la infección con el VIH. La fase clínica o SIDA está marcada por la aparición de una o mas infecciones oportunistas típicas definidas en los criterios diagnósticos del CDC que señalaremos mas adelante. Esta etapa clínica se caracteriza por signos y síntomas que reflejan inmunodeficiencia severa. Este síndrome es causado por infecciones oportunistas que ordinariamente no causan enfermedad. Al inicio de la fase clínica del SIDA el paciente empieza a presentar fatiga, pérdida de peso, erupción cutánea persistente, herpes simple y candidiasis oral crónica. Con el avance de la enfermedad puede haber fiebre que persiste por mas de un mes, pérdida involuntaria de peso superior al 10% del peso corporal, diarrea persistente por mas de un mes sin otra causa que explique los síntomas.

Una disminución en la cuenta total de linfocitos CD4 por debajo de 500/ μ L precede a la aparición de SIDA, y una caída en la cuenta a menos de 200 células/ μ L no solamente define SIDA, sino que también indica una alta probabilidad de infecciones oportunistas (Phillips y cols., 1992; Bozzette y cols., 1995).

Otros hallazgos de laboratorio que indican progresión a SIDA incluyen la positividad al antígeno p24 (60% de los casos), incremento en suero de la beta 2 -microglobulina (B2-M), aumento de la IgA en suero, o bien, incremento de los niveles de neopterina en suero, líquido cefalorraquídeo u orina. (Tsoukas y Bernard, 1994).

La neumonía por *Pneumocystis carinii* se produce en 80% de los casos, aunque las infecciones por Citomegalovirus son muy comunes también. Además, entre las infecciones más frecuentes se encuentra la causada por *Cándida albicans* (oral o faríngea), *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* y *M. tuberculosis* en un 10 % de los casos, siendo esta última un problema de salud pública que empieza a cobrar nuevamente importancia epidemiológica.

Un gran porcentaje de pacientes con SIDA presenta diarrea crónica y los agentes frecuentemente aislados son *Criptosporidium* e *Isospora belli*, *Salmonella*, y otros agentes bacterianos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* y en menor frecuencia *Coccidioidomycosis*, *aspergilosis*, *histoplasmosis* y *nocardiosis*.

El sarcoma de Kaposi es un tumor maligno que se desarrolla en la piel, pulmones y tracto gastrointestinal. Este consiste inicialmente de máculas y pápulas de forma irregular y luego forman nódulos dolorosos. Se caracteriza anatomopatológicamente por la proliferación de una población celular mixta que incluye células endoteliales. En las fases iniciales, las lesiones suelen ser indoloras, pero en la forma diseminada se afectan con mayor frecuencia los ganglios linfáticos y los sistemas gastrointestinal y pulmonar. En los estados avanzados del sarcoma puede haber lesiones gastrointestinales y sangrado, dificultad en la ventilación, expectoración con sangre y tos.

Aparte del sarcoma de Kaposi, también se pueden desarrollar ciertos tumores linfoides del tipo no Hodgking, incluyendo el linfoma cerebral primario de células B. Además del cerebro, otras localizaciones extranodales frecuentes del linfoma son la médula ósea, el aparato gastrointestinal, el hígado, la piel y las membranas mucosas (Greene, 1991; Lang y cols., 1989).

1.4 MANIFESTACIONES NEUROLOGICAS ASOCIADAS A LA INFECCION CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Se ha establecido que el 80% de los pacientes que desarrollan el SIDA presentan durante el transcurso de la enfermedad algunos signos o síntomas relacionados a la disfunción del sistema nervioso central (Elder y Sever, 1988).

Asimismo, en un 20 a 30% de los pacientes adultos y hasta en un 50 % de pacientes pediátricos se logra integrar un cuadro característico de disfunción del sistema nervioso central que inicialmente fue llamado complejo demencial asociada al SIDA (ya que fue descrita en pacientes que presentaban el cuadro clínico del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Estudios subsecuentes lo han caracterizado en pacientes seropositivos en estadios tempranos e intermedios de la enfermedad, por lo que su nombre ha cambiado a demencia asociada a la infección con el VIH (DAV) (Epstein, 1988; Jassen, 1989).

Los procesos cognoscitivos están deteriorados, manifestándose por dificultad en la concentración mental, disminución en la velocidad de movimientos y en la sensibilidad (Price, 1988). Atkinson y cols. (1988) reportaron alteraciones de tipo subcortical que involucran un deterioro neuropsicológico demostrable en la velocidad de movimiento, control motor, concentración, resolución de problemas aritméticos y deterioro en la ejecución visual-espacial (Navia y cols., 1986; Price y cols., 1988; Grant y cols., 1987).

En la siguiente figura (figura 2) se indican los hallazgos neurológicos mas comunes en pacientes infectados con el VIH durante las tres etapas clínicas.

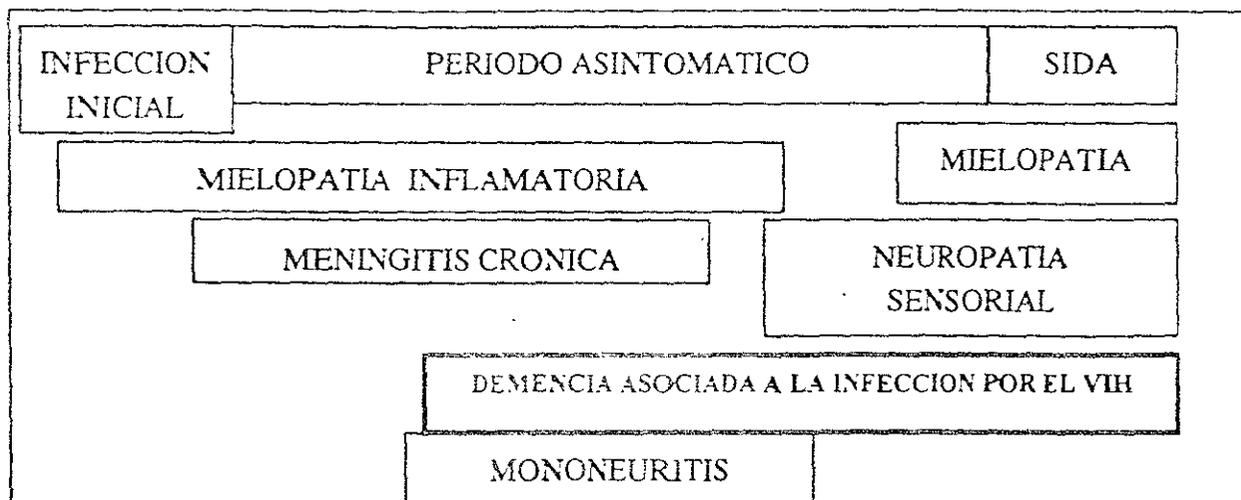


FIGURA 2: En este esquema se muestra la relación entre la evolución clínica y el desarrollo de patologías que indican una alteración del sistema nervioso durante el transcurso de las diferentes fases de la infección. Es importante señalar que la frecuencia de pacientes que presentan alguna sintomatología asociada con afección del sistema nervioso es de 85 %, y del 20 a 30% integra un cuadro neurológico llamado demencia asociada a la infección con el VIH. Este cuadro abarca desde el periodo asintomático hasta el periodo del SIDA (traducido de Power y cols., HIV-1 Associated Dementia: Clinical Features and Pathogenesis, 1995).

Clínicamente la DAV empieza con un deterioro en la memoria, en la capacidad de concentración y disminución en la velocidad de los procesos mentales, apatía y psicosis. Esto es progresivo, ya que con el tiempo aparece el deterioro motor tal como ataxia y tremor.

1.4.1 CRITERIOS PARA EL DIAGNOSTICO PROBABLE DE DEMENCIA ASOCIADA A LA INFECCION CON EL VIH

Los criterios diagnósticos utilizados por el Working Group of the American Academy of Neurology AIDS Task Force (1991), para establecer la existencia de Demencia asociada a la infección con el VIH son los siguientes:

- 1) Evidencia de infección con el VIH
- 2) Anormalidad adquirida en por lo menos dos de las siguientes habilidades cognitivas (presente por lo menos un mes):
- 5) atención/concentración,

- 6) velocidad de procesamiento de la información,
- 7) abstracción/razonamiento,
- 8) habilidad visual-espacial,
- 9) aprendizaje/memoria,
- 10) lenguaje.

La intensidad del deterioro debido a disfunción cognoscitiva debe clasificarse de acuerdo a la tabla propuesta por Portegies (1994) :

CLASIFICACION DE LA INTENSIDAD DEL DETERIORO NEUROLOGICO DESCRITO EN PACIENTE INFECTADOS CON EL VIH.

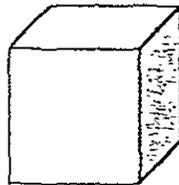
Estado	Categoría	Características
0	Normal	No hay evidencia de disfunción nerviosa
0.5	Subclínico	Hay muy pocos síntomas que podrían interferir con la ejecución de las actividades diarias. Entre los posibles síntomas se puede encontrar disminución en la velocidad de movimientos oculares o de las extremidades.
1	Leve	Evidencia de disfunción intelectual y motora, sobre todo aquellos que involucran los movimientos de los miembros superiores.
2	Moderado	No puede ejecutar movimientos indispensables para la vida diaria (de autocuidado)
3	Severo	Existe una incapacidad intelectual mayor (no puede seguir eventos personales o novedosos, no puede mantener una conversación compleja o tiene disminución evidente en la velocidad de los movimientos) y muy frecuentemente un deterioro o debilidad motora.
4	Estado final	Este es un estado casi vegetativo. No hay respuesta nerviosa a la estimulación nociceptiva.

Tabla 2: Esta tabla clasifica la intensidad del deterioro neurológico descrito en pacientes infectados con el VIH. Para esto, se da una valoración numérica que indica el estado del paciente, seguido de una categoría equivalente y sus características clínicas.

El deterioro en la función motora y neuropsicológica debe ser evaluado por examinación clínica y la evaluación neuropsicológica se realiza con la prueba presentada en la tabla 3

TABLA 3: PRUEBA PARA VALORAR EL DETERIORO NEUROLOGICO EN PACIENTES CON DAV

PUNTUACION	PUNTUACION	ESCALA DE MEDICION
4	()	REGISTRO DE LA MEMORIA Dar cuatro palabras para recordar (perro, gato, verde, chabacano)
4	()	ATENCION Movimientos oculares: 20 comandos. _____ errores de 20 ensayos
5	()	VELOCIDAD PSICOMOTORA Pedirle al paciente que escriba el alfabeto en letras mayúsculas en forma horizontal en una página y registre el tiempo en: _____ segundos
4	()	EVOCACION DE LA MEMORIA Preguntar por las cuatro palabras mencionadas anteriormente. Dar un punto por cada opción correcta.
2	()	CONSTRUCCION Copiar este cubo en una hoja de papel y registrar el tiempo en segundos.



PUNTUACION. _____ /

TABLA 3: Esta prueba es utilizada para la evaluación del deterioro neurológico del paciente con sospecha de demencia asociada a la infección con el VIH. MEMORIA: Para evaluar la memoria inmediata y tardía, aquí se le ofrece al paciente una lista de cuatro palabras (por ejemplo: perro, gato, verde, chabacano) para que las recuerde en dos ocasiones; la primera ocasión lo hará inmediatamente (REGISTRO DE LA MEMORIA), y la segunda, la hará más tarde en el transcurso de la prueba (EVOCACION DE LA MEMORIA). Se le asigna un punto por cada opción correcta. La prueba de atención utiliza una pantalla de computadora donde al paciente se le presentan 20 comandos que aparecen aleatoriamente. Se miden los movimientos oculares hacia el comando y se cuentan los aciertos. Esta evaluación es de 4 puntos, siendo el criterio el siguiente: si el paciente comete \leq de 3 errores se le dará una puntuación de 4, si comete 4 errores la puntuación será de 3, si comete 5 errores la puntuación será de 2, y finalmente si comete 6 errores la puntuación será de 1; más de 6 errores la puntuación es igual a 0 (≤ 3 errores=4; 4 errores=3; 5 errores=2; 6 errores=1; $>6=0$).

La siguiente valoración es la velocidad psicomotora, donde se le pide al paciente que escriba el alfabeto en letras mayúsculas en forma horizontal en una página y se registra el tiempo en segundos. La puntuación que se asigna es la siguiente: tiempo ≤ 21 segundos = 6; 21.1 a 24 = 5; 24.1 a 27 = 4; 27.1-30 = 3; 30.1-33 = 2; 33.1-36 = 1; $> 36 = 0$

La siguiente valoración es nuevamente la evocación de la memoria. Para esto, se le pide al paciente que evoque nuevamente las cuatro palabras mencionadas inicialmente. Se asigna un punto por cada opción correcta.

La parte final de la valoración es dibujar un cubo tridimensional el cual esta impreso en una hoja anexa. En esta prueba se registra el tiempo en segundos en que el paciente dibuja dicho cubo, siendo la calificación la siguiente: tiempo < 25 segundos = 2; 25-35 segundos = 1; > 35 segundos=0.

La suma total de esta prueba es de 20 puntos. La existencia de una puntuación menor indica el grado de déficit cognoscitivo y/o motor.

1.4.2 CICLO SUEÑO-VIGILIA:

Diferentes alteraciones del ciclo sueño-vigilia han sido documentadas en pacientes infectados con el virus del VIH y al mismo tiempo se han reportado variaciones de acuerdo al curso de la enfermedad. En pacientes seropositivos sin demencia se han encontrado periodos de ondas delta en el registro de la segunda fase nocturna. Norman y cols. en 1992 demostraron un incremento y desplazamiento en el porcentaje del sueño de ondas lentas (SOL) en la fase terminal del periodo nocturno. El estado de vigilia, así como las fases tres y cuatro de sueño lento y el sueño de movimientos oculares rápidos parecen estar dispersos durante toda la noche. Cuando se realiza un análisis de la relación del sueño MOR/noMOR (sueño de ondas lentas) se encuentra también que estos están frecuentemente interrumpidos en un 30% de los casos. Wiegand y cols. en 1991, describen que los pacientes seropositivos presentan un deterioro del sueño nocturno con una reducción del tiempo total, alargamiento de la latencia para la aparición de sueño, disminución de la eficiencia de sueño, más despertares nocturnos, aumento de la vigilia, aumento del SOL fase I y disminución del SOL fase II. La latencia para el sueño MOR también está disminuida (Kubicki y cols., 1988; Norman y cols., 1990; Darko y cols., 1992; 1995a y 1995b; White y cols., 1995).

1.4.3 POTENCIALES PROVOCADOS:

El estudio de los potenciales provocados auditivos, visuales y somatosensoriales en pacientes asintomáticos y con SIDA han reportado que los potenciales auditivos provocados del tallo cerebral presentan una latencia alargada en los componentes I-V y un aumento de la duración de la onda III (Smith y cols., 1990). De acuerdo al trazo normal, la onda I se encuentra asociada a la actividad del VIII par craneal, mientras que la onda III probablemente se genere en el complejo olivar y en tanto la onda V en el lemnisco lateral. Si la onda I es normal, sugiere que el órgano de Corti no está afectado por lo que el sujeto escucha bien, los demás intervalos pueden ser usados para descartar anomalías en las vías auditivas. El retardo de la onda I a III sugiere una lesión baja de puente y un retardo prolongado de III a V sugiere una anomalía localizada entre el puente bajo y mesencéfalo. Estudios realizados en simios infectados con el virus de la inmunodeficiencia simiana (VIS), han permitido encontrar que los potenciales visuales y auditivos están alterados. Los potenciales auditivos de tallo cerebral indican un retardo en las ondas P4 y P5. Asimismo, estos animales muestran una disminución de la amplitud de los potenciales evocados. Por otra parte, los potenciales visuales muestran una onda P2 que ocurre en una latencia corta en los simios infectados con el VIS (Prospéro-García y cols., 1996).

1.5 ALTERACIONES MORFOLOGICAS

Los hallazgos más frecuentes encontrados con el uso de la Tomografía Computarizada (TC) en pacientes seropositivos es atrofia cerebral con dilatación del III ventrículo. Esto se relaciona con el avance de la enfermedad y por lo regular ocurre después de 4 años de evolución o bien, cuando hay síntomas neurológicos que sugieren deterioro del sistema nervioso central. En estados tempranos de la infección, se encuentran datos que sugieren atrofia infratentorial y con el avance de la enfermedad, los daños al cerebro son más difusos y la pérdida de volumen cerebral

se extiende a regiones frontales y temporales. Los patrones de atrofia pueden ser centrales (dilatación ventricular), periférica (dilatación del sulcus) o mixta. La atrofia central que es la que se reporta más frecuentemente parece involucrar estructuras subcorticales. Cuando se realiza una TC en forma continua se demuestra evolución progresiva de la enfermedad (Chrysikopoulos, 1990). La segunda manifestación más frecuente encontrada con la TC es lesiones del parénquima en las regiones periventriculares caracterizados por disminución en la densidad.

En pacientes pediátricos seropositivos, el hallazgo más frecuente es atrofia central, que incluyen atrofia cortical, lesiones en la materia blanca y calcificación difusa en los ganglios basales (algunas veces en forma simultánea con el lóbulo frontal). Las calcificaciones observadas representan una vasculopatía mineral de células endoteliales (Belman y cols., 1988).

Con el uso de la resonancia magnética (MRI) se ha reportado atrofia frontoparietal con pérdida de la sustancia blanca y gris tanto en pacientes seropositivos en la etapa asintomática como en la clínica. En los estados más avanzados y graves se reporta disminución del volumen de los ganglios basales y los datos que sugieren esto es el aumento del radio entre los dos núcleos caudados. La infección acompañada con una tasa alta de replicación viral en la microglia de las estructuras subcorticales pueden ser las causas directas o indirectas de la atrofia cerebral (Berman y cols., 1999). La frecuencia de lesiones en pacientes con demencia es de 78%. Las lesiones más frecuentes son de tipo difuso, localizadas preferentemente en forma periventricular. El patrón intenso observado en la materia blanca indica palidez de la mielina. Dependiendo del grado de las lesiones focales en núcleos más profundos como el tálamo y los núcleos lentiformes es la severidad de la demencia. Otros datos indican también calcificación asociada con dilatación

de los espacios de Virchow-Robin, por lo que la barrera hematoencefálica parece estar alterada, además de lesiones en el cuerpo calloso (Bencherif y Rottenberg, 1988).

Estudios que usan la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) así como la cuantificación del consumo de [18F] Fluoro-2-deoxiglucosa (FDG) reportan aumento del metabolismo en los ganglios basales y tálamo en los estadios previos al desarrollo del cuadro clínico del SIDA, y posteriormente con el progreso de la enfermedad aparece disminución del metabolismo en corteza y estructuras subcorticales. Cuando se usa el muestreo con Neuroimagen Funcional con [99Tc] hexametil-propileneamineoxima (SPECT) se encuentra una prevalencia del 78 al 81% de defectos en la perfusión cortical y subcortical en estados tardíos. Estos defectos son multifocales con predominancia de los lóbulos frontales y ganglios basales, y en menor grado los parietales, temporales y cerebelo (Maini y cols., 1990; Bencherif y Rottenberg, 1988).

1.6 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA E INFECCION CELULAR

Como miembro de la familia de los lentivirus, el VIH requiere del aparato genético del huésped para su replicación (Baltimore 1989). El virus tiene dos copias de ácido ribonucleico (RNA) de alrededor de 9200 bases de nucleotidos el cual se encuentra rodeado de proteínas de nucleocápside de peso molecular de 7 000 (p7) y de 9 000 (p9) (ver figura 3). Junto a estas se encuentran copias de la proteína p31 (endonucleasa/integrasa) y p51/p66 (transcriptasa reversa con dos subunidades: alfa y beta). Rodeando al RNA se encuentra una proteína de 24 000 (p24) daltones que es la más abundante del virus. Asimismo, rodeando al núcleo se encuentra otra capa de proteínas formada por la p17 (proteína de la matriz viral), y por último la envoltura viral. En esta envoltura se encuentran la glicoproteínas de 41 (gp41) y la glicoproteína de 120 (gp120) kilodaltones; la gp41 esta anclada a la doble capa lipídica de la envoltura viral y la gp120 a su vez se encuentra anclada a la gp41.

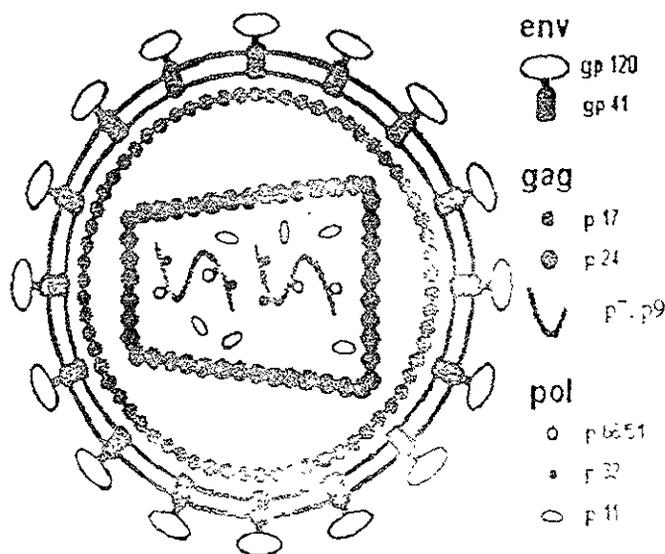


Figura 3: En esta figura se representa al VIH y la organización de sus principales componentes. En el centro de la figura se observan las dos copias de RNA viral rodeado por la p7 y la p9, y unido a estas están las proteínas p66/51 y p32, y más externamente la p11. Estos componentes están protegidos por la p24 (cono truncado) y periféricamente se encuentran la p17, y finalmente la envoltura viral. La gp41 forma parte de la envoltura viral y unido en forma externa se encuentra la gp120.

El genoma del VIH es similar al de otros retrovirus. Contiene tres genes mayores: *gag*, *pol* y *env*. Estos genes codifican para los componentes funcionales y estructurales del VIH. *Env* codifica para las glicoproteínas de la membrana gp41 y gp120, las cuales derivan de un precursor de 160 kD. *Gag* codifica para las proteínas de la nucleocápside p24 (cápside o core antigen), p17 (matriz) y la p7 y p9, obtenidas por procesamiento de un precursor p55. *Pol* codifica para enzimas p66/p51 (transcriptasa reversa), p11 (proteasa) y la p32 (integrasa) (Klatt, 2000).

Asimismo, es importante mencionar a los genes accesorios incluyen a: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, y *vpu* (para el VIH-1) ó el *vpx* (para el VIH-2). La función de alguno de estos genes todavía es desconocida. El gen *tat* produce proteínas reguladoras que aceleran la transcripción del provirus del VIH. El gen *rev* codifica para proteínas reguladoras que participan en la producción de otras

proteínas y enzimas estructurales virales. El gen *nef* produce proteínas reguladoras que hacen que la célula infectada sea mas apropiada para la producción de una cantidad mayor de viriones. A su vez, los genes *vif*, *vpr* y *vpu* codifican proteínas que parecen jugar un papel en el incremento de la infectividad y patogenicidad del VIH (Levy, 1993). A continuación se representa a los genes antes descritos y su ubicación con respecto a los genes mayores.

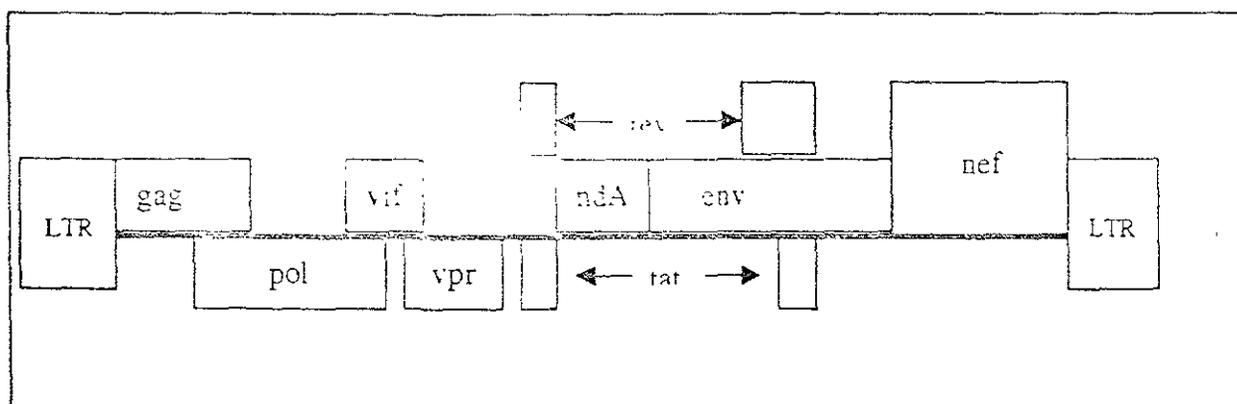


Figura 4: Este esquema representa la organización de los genes mayores y de los accesorios del VIH. Se observa la localización de los tres genes mayores (*gag*, *pol* y *env*), que codifican para los componentes funcionales y estructurales del VIH. Asimismo, se presentan los genes accesorios incluyen a: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, y *vpu* (para el VIH-1) ó el *vpx* (para el VIH-2).

El proceso de infección inicia con la unión del VIH a través de la gp120 con la molécula CD4 que es expresada en las células inmunes cooperadoras, así como las pertenecientes a las líneas celulares monocito/macrófago. Demaria en 1996 y Kwong en 1998 proponen el probable mecanismo en la interacción entre el virus y la célula blanco. Primero, la gp120 interacciona con el receptor CD4. La gp120 tiene una región (asa V3) que interacciona con este receptor y esta unión expone a la gp41 a los correceptores CXCR4 o CCR5. Esto es seguido de la fusión de la envoltura viral con la membrana celular (Demaria y Bushkin, 1996, Kwong y cols., 1998). Después de esta unión el núcleo viral que tiene dos cadenas idénticas de RNA, así como proteínas y enzimas estructurales entra a la célula. La información genética contenida en el RNA

viral es transcrita a ácido desoxirribonucleico (DNA) por la enzima viral transcriptasa reversa DNA-polimerasa dependiente. Esta enzima hace por tanto una copia de DNA de una sola cadena. Después de la destrucción de la cadena del RNA por la actividad de la RNAasa-H viral, la polimerasa usa el DNA como plantilla y hace una copia complementaria de DNA, formando un DNA de doble cadena, dando paso a la formación del complejo pre-integración. Este complejo entra al núcleo celular se integra al genoma del huésped a través de una integrasa. La transcripción de estas secuencias da origen a un precursor largo que es cortado por proteasas codificadas por el gen *pol* por la formación de viriones. Estos viriones forman su membrana externa a partir de la propia membrana celular. El siguiente paso es la liberación de los nuevos viriones, completando el ciclo viral de 2.6 días.

1.7 PROBABLE PAPEL DEL VIRUS EN LA DAV

Las primeras hipótesis para explicar la demencia proponían que en realidad se trataba de una complicación debida a las infecciones oportunistas sobre el SNC, o bien, la existencia de tumores cerebrales (Johnson y cols., 1988). Sin embargo, hallazgos posteriores demostraron la presencia del virus en el parénquima cerebral, así como títulos elevados de anticuerpos anti-VIH en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con SIDA (Buzy, 1989).

Las células infectadas por el VIH que se encuentran en el sistema nervioso central son los macrófagos (los cuales son potencialmente la fuente de infección del SNC al migrar a través de la barrera hematoencefálica), la microglia y las células gigantes multinucleadas (Srinivasan 1988; Lipton, 1995). Al mismo tiempo, se demostró que los astrocitos y los oligodendrocitos se infectan en menor porcentaje y que las neuronas muy raramente se infectan (menos del 1%) (Power y cols., 1994).

1.8 gp120 Y DAÑO NEURONAL

La caracterización bioquímica del LCR de pacientes seropositivos o con SIDA determinó la presencia de un factor soluble con peso molecular entre 100 y 140 kDa, lo cual era consistente con la probable presencia de un componente con peso molecular en ese rango. Este factor presentaba efectos neurotóxicos, lo que hizo pensar que gp120 pudiera jugar un papel importante en el daño neuronal (Ruff y cols., 1990; Hill y cols., 1993). Estos hallazgos apoyaron los estudios hechos por Oh y cols. en 1992, donde se pudo aislar gp120 del suero de 22 pacientes de 32 incluidos en un protocolo de estudio, usando anticuerpos dirigidos a las regiones 303-338 de la gp120. Por otra parte, cuando se analizaron muestras de pacientes en estados más tempranos de la infección, se encontró también la presencia de la gp120. Cuando se aplicó gp120 en cultivos de hipocampo se encontró que se inducía muerte celular hasta un 40% cuando se probaron diluciones de 1:1000 hasta 1:100 000 veces (Buzy y cols., 1992). Esto comprobaba la sugerencia hecha por Brenneman y cols. (1988) quienes establecían que el daño neuronal no era resultado de la infección viral, sino que probablemente era debido a la interferencia de un factor soluble derivado de la envoltura viral, que al parecer era similar a una sustancia neurotrófica endógena llamada péptido intestinal vasoactivo (VIP). Este grupo demostró que una secuencia de aminoácidos contenida en el VIP también está presente en la gp120 y esto explicaba que ambos (VIP y gp120) compitieran por el mismo receptor: el CD4. Posteriormente estos autores demostraron que el uso de anticuerpos contra el CD4 o bien la administración de VIP en presencia de gp120 prevenía la neurotoxicidad previamente demostrada cuando se administraba solamente gp120.

La exposición de tejido cerebral a concentraciones bajas de glicoproteínas de la envoltura del VIH provoca un daño morfológico neuronal similar a lo encontrado en pacientes con encefalitis

asociada a este virus. Este daño se relaciona además con el retardo de conductas motoras complejas y ejecución (Brenneman y cols., 1988). Además, estos mismos autores demostraron que las células hipocampales de rata mueren a muy bajas concentraciones de la gp120 (con rango de 0.01-1.0 pM). Mientras la gp120 empieza a tener apoyo importante para ser propuesta como factor con efectos neurotóxicos directos en las neuronas, la hipótesis de la vía indirecta también empieza a tener mucha relevancia, entre ellos, la presencia de productos tóxicos como el óxido nítrico, especies reactivas de O₂, glutamato y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), ya que los niveles de estos componentes se encuentran elevados en pacientes que han desarrollado demencia (Gendelman, 1994; Lipton, 1995).

Diversos modelos trataron de explicar la participación de la gp120 tanto por vía directa sobre las neuronas, como por una vía indirecta sobre la microglia. Esta segunda vía, indirecta, sería la encargada de la producción de citocinas y el consiguiente daño neuronal.

Para esto, se propuso una hipótesis, donde la misma gp120 participaría en la activación de microglia con la consiguiente alteración del metabolismo del glutamato y del K⁺ con el consiguiente daño y pérdida neuronal (figura 5).

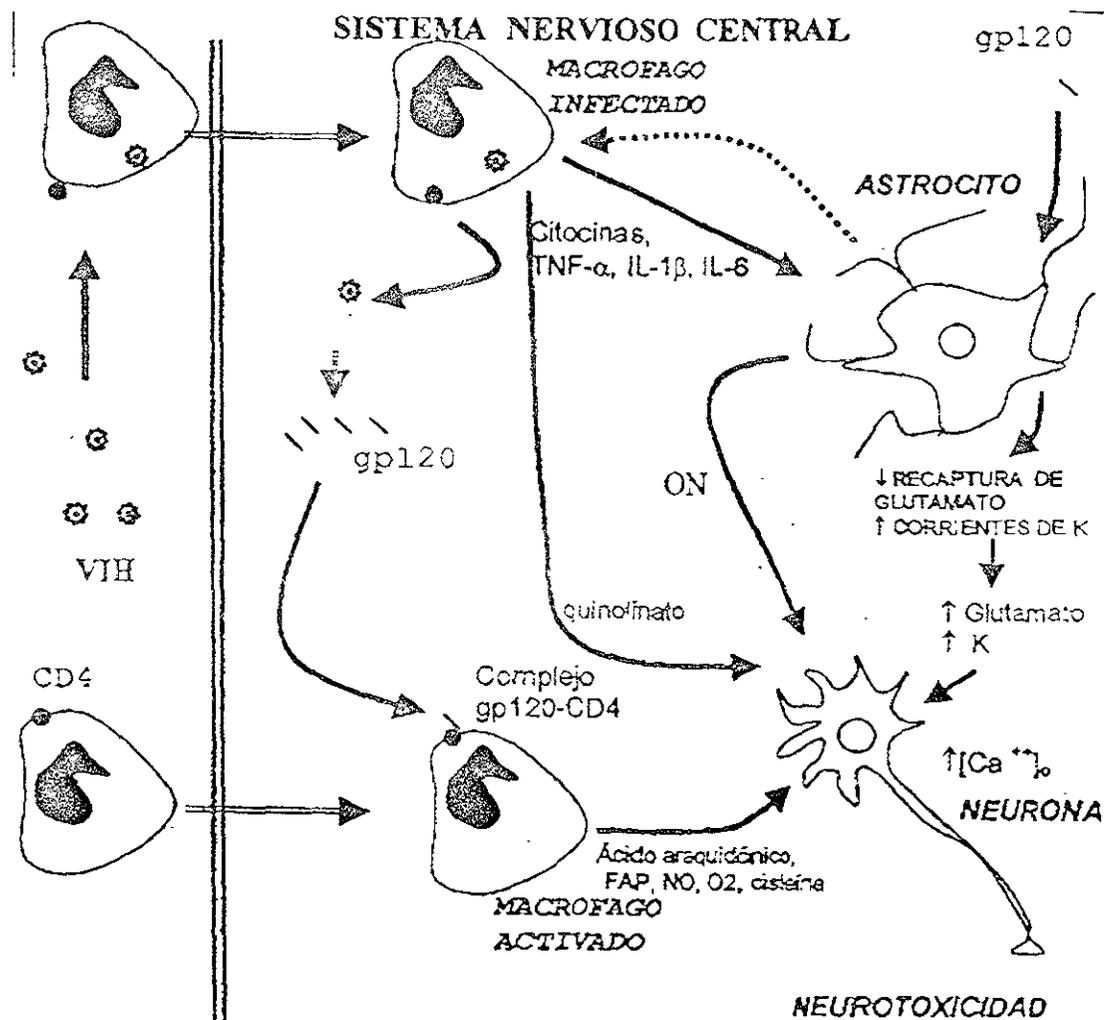


Figura 5: En esta figura se recopila el probable mecanismo por el cual se induce la neurotoxicidad en el sistema nervioso central por el VIH y la gp120. El macrófago infectado libera citocinas que activarían a los astrocitos los cuales van a modificar su metabolismo, con la consiguiente disminución en la recaptura de glutamato y aumento de corrientes salientes de K. La producción de óxido nítrico sería un factor que aumentaría la producción de radicales libres. Asimismo los macrófagos activados por la gp120 (no infectados) inducirían un aumento en la producción de citocinas. El aumento de glutamato y de [K]_o participaría en la despolarización y aumento de [Ca²⁺]_i, seguida del daño neurotóxico (Lipton, 1998; Benos y cols., 1995a).

Para esto, experimentos bioquímicos y biofísicos demostraron que la gp120 actuaría por medio de una tirosina cinasa en el astrocito, que influiría en el transporte activo de H⁺ y Na⁺ con la consecuente alcalinización del medio intracelular e inhibición de la recaptura del glutamato dependiente del Na⁺ en los astrocitos, lo que se asocia al mismo tiempo con salida de glutamato

de estas células. Esto activaría a los canales de K^+ provocando un aumento de glutamato y K^+ extracelular, activando consecuentemente a receptores NMDA y despolarizando a las neuronas aledañas con la consecuente entrada masiva de Ca^{++} y su efecto neurotóxico (Benos y cols., 1994; Lipton, 1998; ver figura 6).

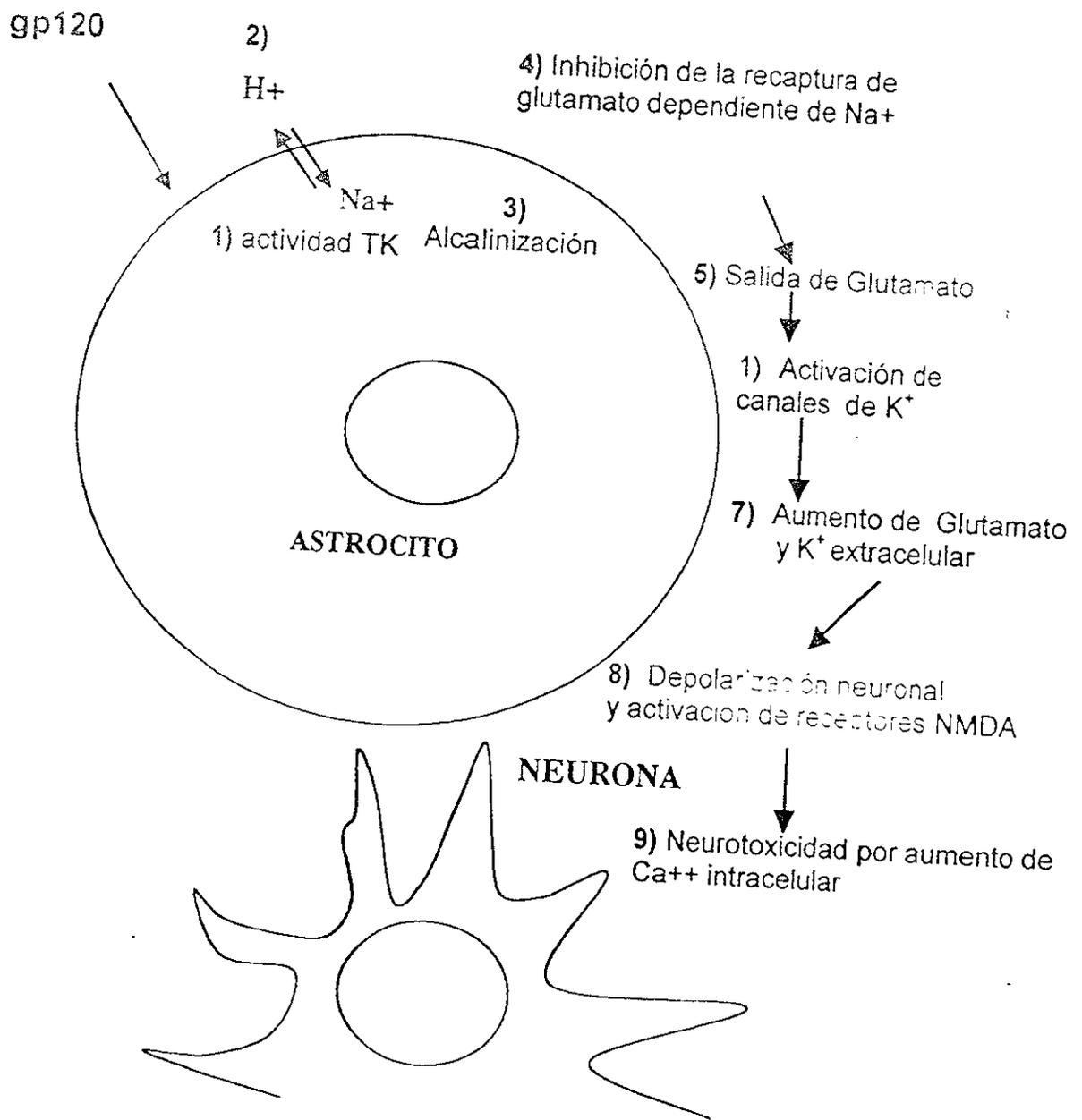


Figura 6: Mecanismo hipotético indirecto por el cual se propone que la gp120 induce el daño neuronal. El requisito primario sería la activación de los astrocitos, provocando un desequilibrio en el metabolismo del K y de Glutamato. El aumento en la concentración de Glutamato y K^+ extracelular, aumentan la excitabilidad neuronal con el consecuente aumento de Ca^{++} intracelular a través de los receptores NMDA (Lipton, 1998, Benos y cols., 1995a; Benos y cols., 1995b; Buben y cols., 1995)

Por otra parte Meucci y cols. (1998) indican que probablemente la gp120 induzca la entrada de Ca^{++} a través de la activación del correceptor CCR5 o CXCR4 en las neuronas, en tanto que Pattarini y cols. (1998) proponen que el sitio para la glicina en el receptor NMDA sea el responsable de la entrada masiva de Ca^{++} , y la consecuente neurotoxicidad por niveles altos de Ca^{++} .

1.9 PROBABLE PAPEL DE LOS RECEPTORES A LAS CITOCINAS EN LA PRODUCCION DE LA DAV

Como ya mencionamos, los receptores CD4, CCR5 y CXCR4 están involucrados en los mecanismos de infección viral (Demaria en 1996 y Kwong en 1998), y actualmente son candidatos muy importantes para explicar la neuropatología de la infección con el VIH (Meucci y cols, 1998).

Algunos pacientes caucásicos seropositivos que progresan muy lentamente, o son resistentes a la infección, presentan un receptor modificado (ccr5- Δ 32) el cual tiene una delección de 32 pares de bases y por tanto la molécula está truncada y no se expresa en la superficie celular. Experimentos subsecuentes demostraron que las células sanguíneas de estos pacientes se pueden infectar por cepas virales que utilizan para la infección el correceptor CXCR4 (Curran y cols., 1988; Coutlee y cols., 1994). Estudios subsecuentes indicaron que los receptores a quimiocinas CCR3, CCR5 y CXCR4 están presentes en subpoblaciones de neuronas en la corteza cerebral de humanos y macacos, específicamente en neuronas hipocámpales y neuronas piramidales neocorticales, así como células gliales, en tanto que los receptores CCR5 y CXCR4 han sido caracterizados en astrocitos en estas mismas muestras (Westmerland y cols., 1998; Vallat y cols., 1998).

Los receptores a quimiocinas responden a su ligando apropiado provocando un incremento en los niveles de calcio intracelular, pero recientes experimentos han establecido que la gp120 actúa en los receptores a quimiocinas provocando un aumento intracelular de calcio (Meucci y cols, 1998). Esta respuesta se antagoniza cuando se utilizan anticuerpos contra el receptor.

El cultivo de neuronas de macaco presenta un flujo de calcio cuando se le administra la proteína de la envoltura viral SIVmac239, sugiriendo que sea a través de esta vía el efecto neurotóxico. Para ver este efecto, es necesario el acoplamiento con las proteínas Gi (Luster, 1998).

Brevemente, las citocinas son un grupo de proteínas que intervienen en las respuestas inmunes de defensa como: activación inmune, inflamación, choque séptico, angiogénesis, adhesión celular, apoptosis e inhibición de la replicación viral. Cada citocina puede tener varios efectos biológicos mediante su unión con receptores específicos. Estas activan sistemas intracelulares de segundos mensajeros, que modifican la actividad de factores de transcripción. Estos factores de transcripción reconocen secuencias específicas de los promotores de algunos genes entre los que están aquellos que codifican para otras citocinas.

Dentro de las citocinas tenemos a las quimiocinas, que son una familia de péptidos de 70 a 90 aminoácidos divididos en dos grupos. α -quimiocinas o quimocinas CXC (tienen un aminoácido entre el primero y segundo residuos de cisteína) y β -quimiocinas o quimocinas CC (tienen dos residuos de cisteína adyacentes)(Hoffman y Doms, 1998). Los leucocitos responden a las quimocinas a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

La secuencia de aminoácidos de los receptores que unen ligandos funcionalmente relacionados tiene una similitud del 20-80%. Inclusive se ha aislado un receptor promiscuo, que fija tanto quimocinas CXC- como CC- y que al comparar su homología con los receptores respectivos, esta es de 25%. En la tabla 3 ilustramos los correceptores que han sido identificados y su alta

afinidad con VIH y el VIS. Las evidencias mas consistentes son para los receptores CCR3, CCR5 y el CXCR4.

Correceptores para los virus de inmunodeficiencia humana y simiana				
Correceptor	Otros nombres	Ligandos	Fusión viral	Expresión en la población celular CD4 (nativas)
CXCR4	LESTR, FUSINA	SDF-1	VIH T-trófico	Macrófagos, linfocitos T CD4+
CCR5	CKR5	MIP1- α , MIP1 β , RANTES	VIS, VIH M-trófico	macrófagos, células T CD4+ (memoria)
CCRb2	CKR2b	MCP-1, MCP-2, MCP3, MCP-2	Limitado a VIH	Monocitos, células T CD4-
CCR3	CKR3	Eotaxina, MCO-4, RANTES	HIV-1	Células T CD4+ (ayudadoras)
CXCR1	V28	Fractalkina	Limitado a VIH	Células T CD4+
CCR8	ChemR1	I-309	VIS, VIH	Monocitos activos y T CD4+
US28	-	RANTES, MIP- α , MCP-1	Limitado a VIH	¿?
GPR1	-	¿?	VIH y VIS	Macrófagos
GPR15	BOB	¿?	VIH y VIS	Macrófagos y células T CD4+
STRL33	Bonzo	¿?	VIH y VIS	Linfocitos periféricos
Chem R23	-	¿?	Limitado a VIS	Células T CD4+ y dendríticas
APJ	-	¿?	VIH y VIS	¿?

Tabla 4: Los receptores a quimocinas actúan como cofactores de fusión para el VIS y el VIH y son enlistados con los ligandos conocidos, así como el patrón de expresión de las poblaciones celulares CD4+. Es importante notar que el VIH utiliza a los receptores CCR5 o CXCR4, mientras que el VIS utiliza el CCR5 para la entrada viral. Los demás correceptores enlistados han sido probados usando un número limitado de cepas virales. Pero es necesario notar que la relevancia de estos correceptores no esta todavía clara in vivo. (tomado de Hoffman y Doms, Chemokines and correceptors in HIV/SIV-host interactions, AIDS 1998, 12 (suppl A) s17-s26.)

Estos antecedentes son muy importantes de tomar en cuenta para la integración fisiopatológica de la demencia ya que experimentos adicionales han indicado la asociación simultánea entre la

gp120 con el receptor CD4 y diferentes correceptores, así como la asociación de la gp120 con receptores independientes sin necesidad de la interacción con CD4.

2.1 JUSTIFICACION

Se ha estimado que un 20 a 30 % de pacientes adultos y hasta 50 % de pacientes pediátricos portadores del VIH desarrollan la DAV. La deficiencia cognoscitiva y el deterioro en los movimientos, sensibilidad, memoria y la ejecución de tareas visio-espaciales son hallazgos comunes en pacientes con demencia. Se ha documentado también que la memoria se deteriora tan solo por la presencia de la gp120 derivada del VIH en la adquisición de una tarea de discriminación espacial. Además, el líquido cefalorraquídeo de pacientes con SIDA que presentan deterioro cognoscitivo, produce efectos similares a los observados con gp120 *in vitro*.

El deterioro del sueño observado en los estados tempranos de la infección se caracteriza por un incremento del sueño de ondas lentas así como una distribución anormal del mismo en la segunda mitad del periodo de sueño en algunos pacientes. Asimismo, la disminución del tiempo total de sueño acompañado de una mayor fragmentación, así como disminución de los estados de alerta se ha observado en estados avanzados de la infección. Hallazgos similares han sido reportados en un modelo felino de SIDA infectado con la cepa Maryland o PPR del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). En este modelo, la latencia al sueño MOR está retardada, y además hay mas transiciones del sueño a la vigilia.

Debido a que las neuronas no se infectan directamente con el VIH, se piensa que la DAV puede ser el resultado de un factor derivado del virus o del propio huésped que actúa a través de un mecanismo indirecto o bien, a través de un mecanismo directo.

La glicoproteína 120 derivada del VIH parece jugar un papel importante en el desarrollo de la DAV. Hay evidencias que indican que concentraciones nanomolares de la gp120 derivada del

gp120 con el receptor CD4 y diferentes correceptores, así como la asociación de la gp120 con receptores independientes sin necesidad de la interacción con CD4.

2.1 JUSTIFICACION

Se ha estimado que un 20 a 30 % de pacientes adultos y hasta 50 % de pacientes pediátricos portadores del VIH desarrollan la DAV. La deficiencia cognoscitiva y el deterioro en los movimientos, sensibilidad, memoria y la ejecución de tareas visio-espaciales son hallazgos comunes en pacientes con demencia. Se ha documentado también que la memoria se deteriora tan solo por la presencia de la gp120 derivada del VIH en la adquisición de una tarea de discriminación espacial. Además, el líquido cefalorraquídeo de pacientes con SIDA que presentan deterioro cognoscitivo, produce efectos similares a los observados con gp120 *in vitro*.

El deterioro del sueño observado en los estados tempranos de la infección se caracteriza por un incremento del sueño de ondas lentas así como una distribución anormal del mismo en la segunda mitad del periodo de sueño en algunos pacientes. Asimismo, la disminución del tiempo total de sueño acompañado de una mayor fragmentación, así como disminución de los estados de alerta se ha observado en estados avanzados de la infección. Hallazgos similares han sido reportados en un modelo felino de SIDA infectado con la cepa Maryland o PPR del virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). En este modelo, la latencia al sueño MOR está retardada, y además hay mas transiciones del sueño a la vigilia.

Debido a que las neuronas no se infectan directamente con el VIH, se piensa que la DAV puede ser el resultado de un factor derivado del virus o del propio huésped que actúa a través de un mecanismo indirecto o bien, a través de un mecanismo directo.

La glicoproteína 120 derivada del VIH parece jugar un papel importante en el desarrollo de la DAV. Hay evidencias que indican que concentraciones nanomolares de la gp120 derivada del

VIH produce muerte neuronal *in vivo*, y concentraciones picomolares matan a neuronas *in vitro*. Con base a lo anterior nuestro protocolo fue diseñado para partir de un estudio conductual y ser continuado con un estudio electrofisiológico y bioquímico. Para esto, propusimos los siguientes objetivos:

2.2 OBJETIVOS

Evaluar el efecto que tiene la gp120 derivada del VIH o del VIF sobre:

1. La habilidad de la rata para resolver el laberinto espacial.
2. El control de la postura y el movimiento de la rata.
3. La actividad locomotora espontánea.
4. La generación de AMPc en el hipocampo.
5. La generación de LTP hipocampal.
6. El ciclo sueño-vigilia.

2.3 HIPOTESIS

-La gp120 derivada del VIH y del VIF, deteriora la adquisición de la tarea espacial en la rata adulta.

-La gp120 del VIH o del VIF, producen un deterioro motor en la rata. Asimismo deterioran la inducción de LTP y de AMPc en el hipocampo.

-La gp120 derivada del VIH y del VIF, produce alteraciones del ciclo sueño/vigilia en la rata adulta.

2.4 METODOS

2.4.1. ESTUDIOS PILOTO PARA DETERMINAR LA CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA gp120 SOBRE LA CONDUCTA EN LA PRUEBA DE PREVENCION PASIVA

Para determinar los efectos de la administración intracerebroventricular de diferentes dosis de la gp120 en la conducta, realizamos un estudio piloto usando el paradigma conductual de prevención pasiva. Se utilizaron siete grupos de animales (10 sujetos por grupo) que fueron implantados con una cánula guía dirigida al ventrículo lateral (ver mas adelante en el método). Se utilizo un grupo control y seis grupos experimentales. Estos últimos fueron utilizados para recibir diferentes dosis de la gp120 tanto la que deriva del VIF como del VIH de acuerdo al siguiente cuadro:

grupo	1	2	3	4	5	6	7
Tratamiento	NaCl (control)	gp120 VIF 70 ng	gp120 VIH 70 ng	gp120 VIF 350 ng	gp120 VIH 350 ng	gp120 VIF 700 ng	gp120 VIH 700 ng

La dosis mas baja (70 ng) fue usada con base a dos tipos de estudios: primero, los estudios en cultivos de células disociadas de hipocampo (Brenneman y cols., 1988; Buzy y cols 1988; Buzy y cols., 1992) donde se observa mortalidad a muy bajas concentraciones de la gp120 (con rango de 0.01-10 pM). y segundo, los estudios electrofisiológicos (Prospéro-García y cols., 1994; Prospéro-García y cols., 1999) donde se observan alteraciones en la arquitectura se sueño así como en los potenciales evocados de tallo cerebral y potenciales visuales a concentraciones de 5 ng. Al realizar las conversiones de la cantidad en gramos de la gp120 a concentracion molar encontramos que 70 , 350 y 700 equivalen a 0.58, 2.91 y 5.8 pM respectivamente.

TRATAMIENTO

Antes de ser sometidos a la prueba de prevención pasiva, los animales recibieron diariamente una inyección intracerebroventricular de gp120 por cinco días consecutivos.

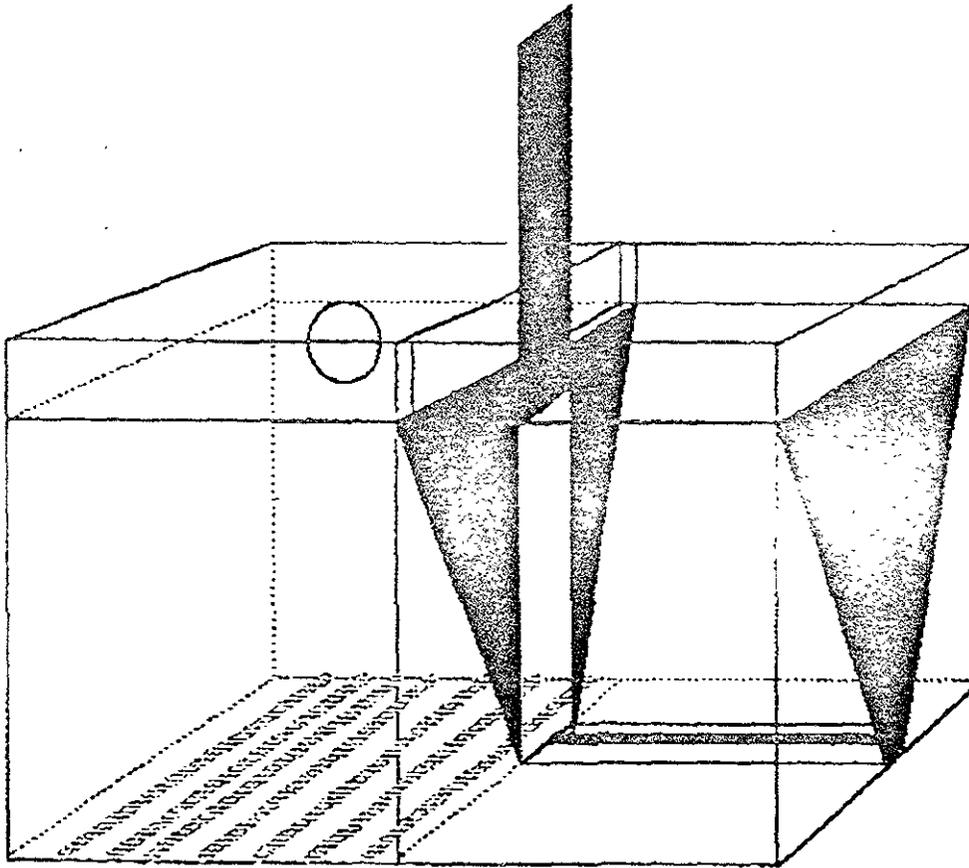
Para esto, se usó un microinyector introducido en la cánula guía. el cual está conectado a través de un tubo de polietileno hacia una microjeringa de 10 μ l. Para cada inyección, se uso un volumen de 5 μ l de vehículo con 14 ng, 70 ng o 140 ng/ μ L de gp120, que al ser administrado por cinco días nos da una concentración final de 70, 350 y 700 ng respectivamente. El grupo control fue tratado con 5 μ l de NaCl al .9%. La tasa de administración fue de 1 μ l minuto, por tanto cada inyección se realizo en un periodo de cinco minutos (aunque se utilizaron dos minutos adicionales mas para favorecer la difusión y evitar reflujo).

PRUEBA DE PREVENCIÓN PASIVA

Dos días después de terminar el tratamiento, las ratas fueron entrenadas en la prueba de prevención pasiva (adquisición) y evaluadas por cinco días (retención).

En forma breve, esta prueba consiste en una cámara dividida en dos compartimentos la cual está automatizada y controlada por una computadora (figura 8). El primero es el de seguridad el cual esta iluminado y tiene unas barras de aluminio en el piso. El segundo está obscuro y tiene dos placas de metal dispuestas en forma diagonal, pero que en el centro forman un piso plano separado por 5 mm. Estas placas están conectadas a una fuente de corriente que permite administrar un choque eléctrico en las patas del animal. Ambos compartimentos están separados por una puerta en guillotina deslizable.

CAMARA DE PREVENCIÓN PASIVA



COMPARTIMIENTO DE
SEGURIDAD

COMPARTIMIENTO DE
CASTIGO

FIGURA 8: Esta figura muestra la cámara de prevención pasiva que consta de dos compartimentos separados por una puerta en guillotina. El primer compartimento es el de seguridad (iluminado) y el segundo es el de castigo (oscuro). Este último está conectado a una fuente de electricidad controlada por un estimulador y permite dar un choque eléctrico al animal cuando este ingresa al compartimento oscuro (ver texto).

La sesión de adquisición consiste en colocar a la rata en el compartimento A por 10 segundos. Seguido de esto, se abre automáticamente la compuerta permitiendo al animal que explore y entre al segundo compartimento. Se da un tiempo límite de 180 segundos para que la rata pase a este compartimento, de otro modo la prueba se da por terminada. Cuando la rata pasa al compartimento de castigo con las cuatro patas, la puerta se cierra

automáticamente y cuando esto ocurre, se administra un choque eléctrico en las patas (0.8 mA por 10 segundos), pero a los cinco segundos la compuerta se abre nuevamente permitiendo al animal escapar al compartimento de seguridad. El tiempo que tarda la rata para escapar es registrado como la latencia de escape. Nuevamente se cierra la puerta y se permite al animal estar en el primer compartimento por 30 segundos antes de ser regresado a su caja en el bioterio. 24 horas después de la sesión de adquisición, se repite la misma prueba, pero la diferencia es de que en esta ocasión, no se administra el choque eléctrico, pero se evalúa el tiempo en que el animal tarda en pasar del compartimento donde anteriormente recibió el castigo (latencia de retención). En caso de que no pase en el tiempo límite de 600 segundos se da por terminada la sesión de retención, pero en el caso de que la rata cruza al segundo compartimento, se cuantifica el tiempo y se da por terminada la prueba. En este experimento, realizamos también mediciones a las 48, 72, 96 y 120 horas después de la sesión de adquisición.

RESULTADOS:

El primer análisis que realizamos fue el de la latencia de adquisición. Los resultados indican que a la dosis donde se observa un deterioro significativo fue a 700 ng, mientras que los grupos tratados con 70 y 350 ng no fueron diferentes al grupo control. En la siguiente figura mostramos el tiempo promedio que los sujetos utilizaron para pasar del compartimento de seguridad al de castigo durante la sesión de adquisición.

LATENCIA DE ADQUISICION

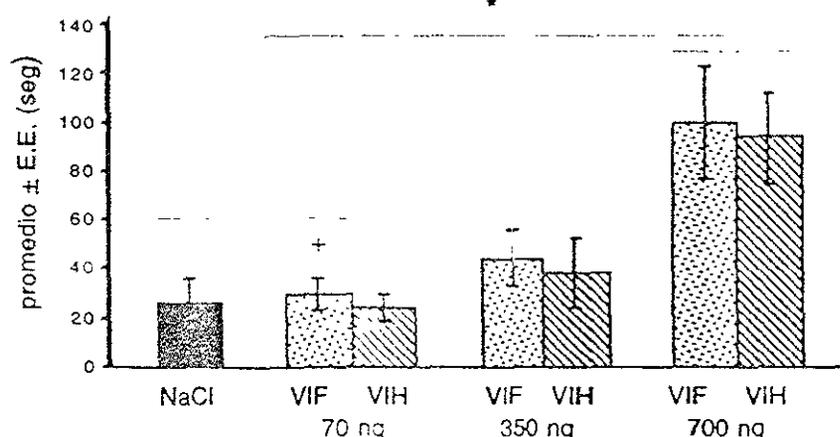


FIGURA 9: En esta figura se muestra el tiempo que tardaron los sujetos en pasar de compartimiento de seguridad al compartimiento de castigo. El promedio \pm E.E. (error estándar) es representado en la columna vertical mientras que en la horizontal tenemos a los grupos y su respectivo tratamiento y dosis. Los grupos significativamente diferentes fueron aquellos tratados con gp120 derivada tanto del VIF como del VIH a dosis de 700 ng con respecto al grupo tratado con salina y al grupo tratado con 70 ng de VIH-gp120 (*). Del mismo modo el grupo tratado con 70 ng de VIF-gp120 solo fue diferente al grupo tratado con 700 ng de VIF-gp120 (ver +) pero no al con el grupo tratado con VIH-gp120. Las significancias de acuerdo a la prueba F de Scheffe son al 95% (ver tabla de análisis de varianza).

Análisis de Varianza				
Fuente	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado promedio	F-test:
Entre grupos	6	59804.094	9967.349	5.469
Dentro de los grupos	63	114816.16	1822.479	p = 0.0001
Total	69	174620.26		

Prueba F de Scheffe							
	salina	VIF 70	VIH 70	VIF 350	VIH 350	VIF 700	VIH 700
salina							
VIF 70	0.002						
VIH 70	0.005	0.015					
VIF 350	0.132	0.098	0.189				
VIH 350	0.153	0.117	0.214	0.001			
VIF 700	* 2.374	* 2.224	* 2.6	1.387	1.322		
VIH 700	* 2.216	1.878	* 2.224	1.117	1.058	0.015	

Tabla 5: En esta tabla mostramos el análisis de varianza donde se indica los grados de libertad entre grupos (gl=6, prueba F= 5.469) así como dentro de los grupos (gl=63, p=0.0001). La prueba pos hoc de Scheffe indica que el grupo tratado con salina es diferente a los grupos tratados con 700 ng de gp120 de VIF o de VIH. El comportamiento del grupo tratado con gp120 de VIH (70 ng) es similar al del grupo tratado con salina, ya que difiere significativamente con los grupos tratados con 700 ng de gp120. El grupo tratado con gp120 de VIF (70 ng) solo difiere con el grupo tratado con gp120 de VIH (700 ng).

El siguiente análisis fue comparar el tiempo que ocupan las ratas para escapar del compartimento de castigo al de seguridad cuando están recibiendo el choque eléctrico.

En la siguiente gráfica mostramos que todos los sujetos tuvieron una latencia similar para escapar al compartimento de seguridad.

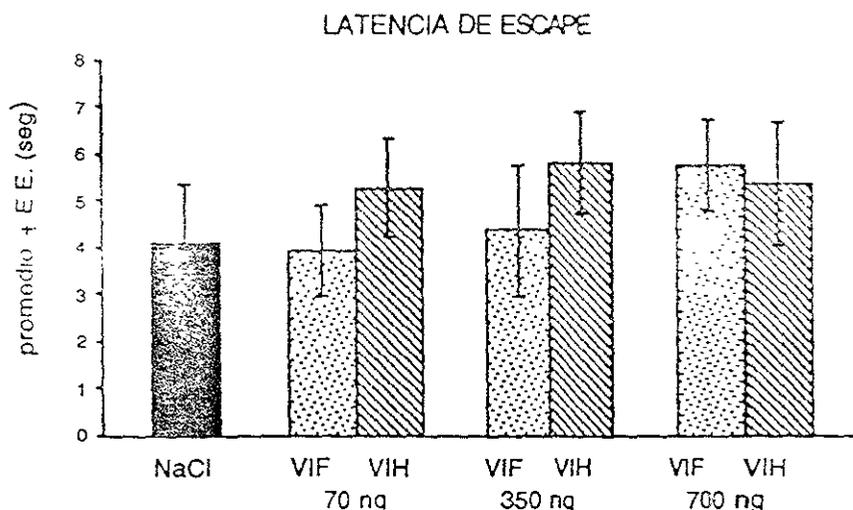


FIGURA 10: En esta figura se muestra el tiempo que tardaron los sujetos en escapar del compartimento de castigo al compartimento de seguridad durante la administración del choque eléctrico. El promedio \pm E.E. (error estándar) es representado en la columna vertical mientras que en la horizontal tenemos a los grupos y su respectivo tratamiento y dosis. Los grupos no mostraron diferencias significativas.

Análisis de Varianza				
Fuente	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado promedio	F-test
Entre grupos	6	36.812	6.135	0.464
Dentro de los grupos	63	833.049	13.223	p = .8324
Total	69	869.861		

Tabla 6: Esta tabla muestra el análisis de varianza para la latencia de escape en la prueba de prevención pasiva. Como se puede observar, no existe diferencia significativa entre los grupos estudiados. Grados de libertad entre grupos (gl=6, prueba F= 0.464) así como dentro de los grupos (gl=63, p=0.8324).

Como podemos observar, no existen diferencias significativas en la latencia de escape entre los grupos estudiados, lo que indica que la actividad motora inducida por el choque eléctrico no está deteriorada.

El tercer análisis fue comparar la retención de la memoria a través del uso de la prueba de Kruskal-Wallis y U Mann-Whitney para ver en que par de grupos existe esa diferencia.

La retención de la memoria fue evaluada en cada grupo tomando en cuenta el tiempo en que tardaron las ratas en cruzar del compartimiento de seguridad al de castigo. La siguiente figura muestra los resultados de los grupos tratados con gp120 a dosis de 70 ng.

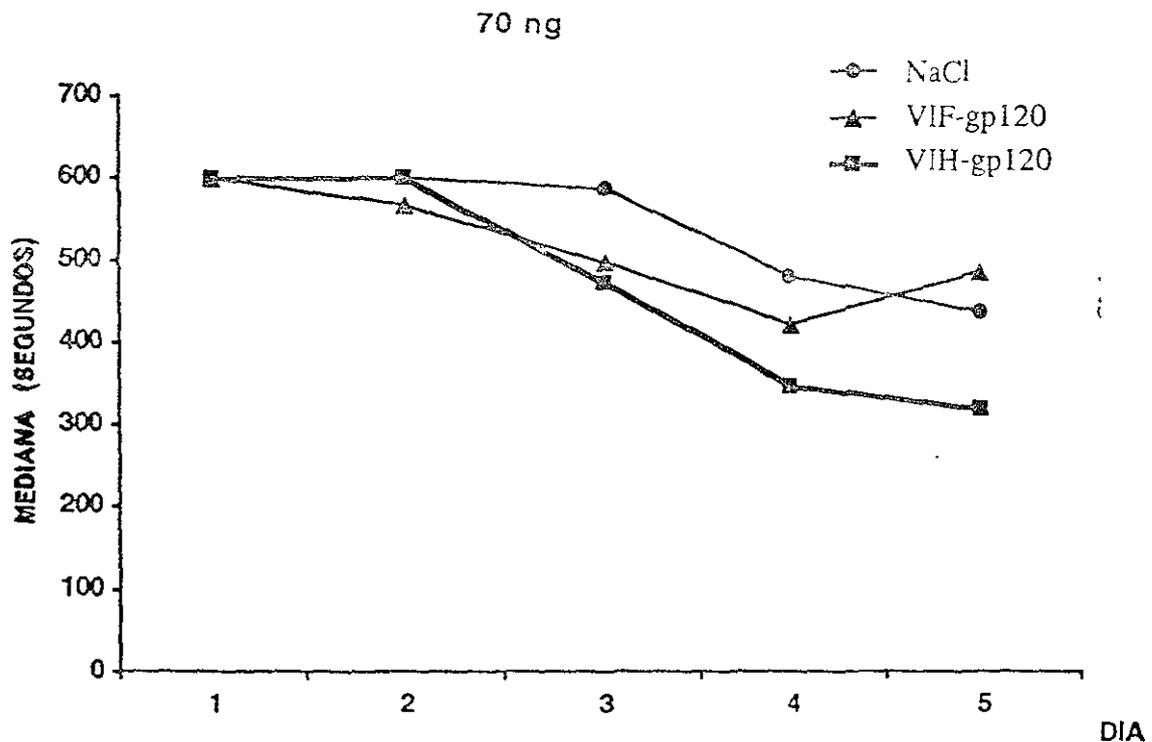


FIGURA 11: En esta figura se muestra el tiempo que tardaron los sujetos en pasar del compartimiento de seguridad al compartimiento de castigo. La mediana del tiempo en cada grupo es representado en la columna vertical mientras que en la horizontal tenemos el día en que se realizaron las mediciones después de la sesión de adquisición. El análisis con la prueba de Kruskal Wallis indica que el valor de p es mayor de 0.05 en todos los casos.

Prueba de Kruskal Wallis

PARAMETRO	Valor				
Grados de libertad	2				
Grupos	3				
casos	30				
H	0.01 p=0.9949	1.086 P=0.5809	1.257 P=0.5335	0.877 p=0.6451	0.637 p=0.7271
H corregida	0.016 p=0.9922	1.28 p=0.5273	1.368 p=0.5046	0.893 p=0.6397	0.67 p=0.7153

Tabla 7: En esta tabla se indican los valores de p obtenidos al comparar la mediana de la retención entre los tres grupos (NaCl, FIV gp120 y VIH gp120) por día. En ninguno de las comparaciones el valor de p fue menor de 0.05.

En la siguiente figura mostramos los resultados obtenidos de los grupos tratados con gp120 a dosis de 350 ng.

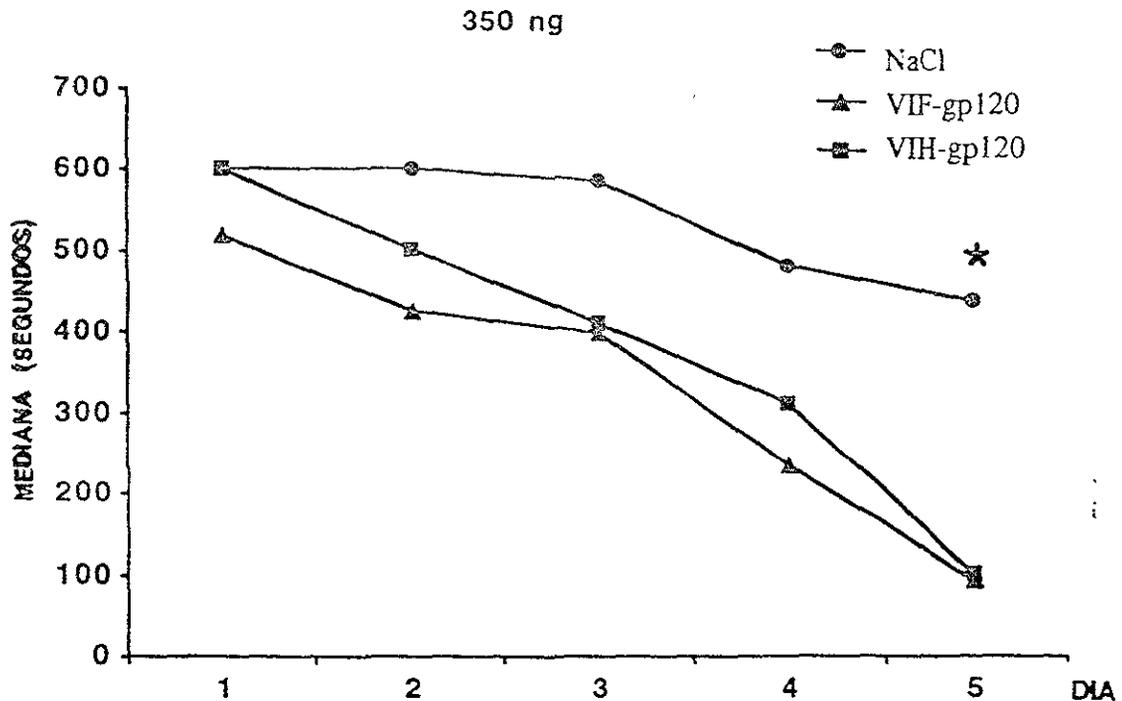


FIGURA 12: Al igual que en la figura anterior, aqui mostramos el tiempo que tardaron los sujetos en pasar del compartimiento de seguridad al compartimiento de castigo. El análisis con la prueba de Kruskal Wallis indica que el valor de p es menor solo en el quinto día (* $p < 0.05$). La prueba U de Mann-Whitney indica que los grupos tratados con ambas gp120 difieren del grupo control (ver significancias en la tabla 8).

Prueba de Kruskal Wallis

PARAMETRO	valor				
Grados de libertad	2				
Grupos	3				
casos	30				
H	2.348 p=0.3092	3.228 p=0.1991	3.956 p=0.1383	5.05 p=0.08	8.343 p=0.0154
H corregida	3.146 p=0.2074	3.513 p=0.1727	4.066 p=0.131	5.073 p=0.0791	8.382 p=0.0151

Prueba U de Mann-Whitney (dia 5)

	Salina	gp120 VIF	gp120 VIH
salina			
gp120 VIF	Z -2.192 p = 0.0284		
gp120 VIH	Z -2.192 p = 0.0665		

Tabla 8: En esta tabla presentamos los resultados del análisis a través de la prueba de Kruskal Wallis y la prueba U de Mann-Whitney. En la primera comparación, se indican los valores de p obtenidos por cada día (Kuskal Wallis). En el unico día en que las diferencias fueron significativas fue el quinto. La prueba U de Mann-Whitney indica que ambos grupos tratados con la gp120 son significativamente diferentes al grupo control (ambos casos, $p < 0.05$).

En la siguiente figura mostramos los resultados obtenidos de los grupos tratados con gp120 a dosis de 700 ng.

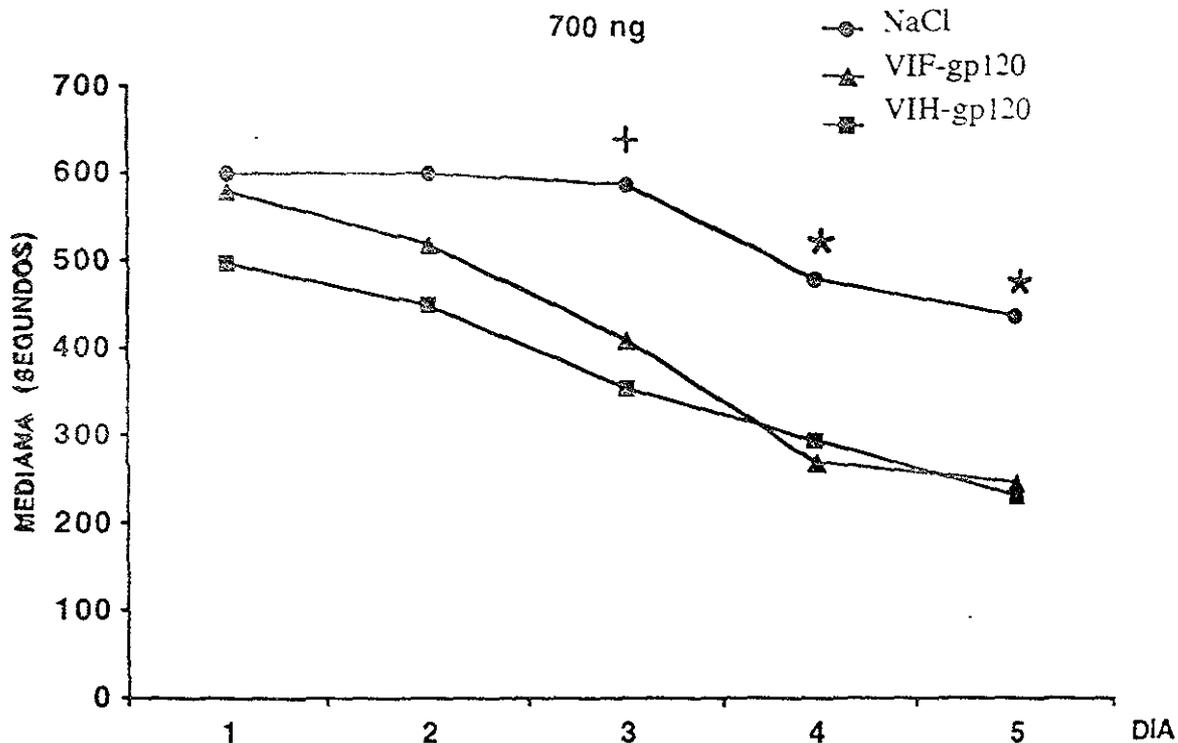


FIGURA 13: En esta figura se muestra un mayor deterioro en la retención de la memoria en los grupos tratados con gp120 con respecto al control a partir del tercer día. El análisis con la prueba de Kruskal Wallis indica que el valor de p es menor de 0.05 en los días 3, 4 y 5. La prueba U de Mann Whitney indica (- $p < 0.05$, grupo salina vs gp120 VIH (día 3); * $p < 0.05$ grupo salina vs gp120 VIH y gp120 VIF (día 4 y 5)

Prueba de Kruskal Wallis

PARAMETRO	valor				
Grados de libertad	2				
Grupos	3				
casos	30	30	30	30	30
H	1.79 p=0.4085	4.128 p=0.1269	8.379 p=0.0152	8.973 p=0.0113	7.438 p=0.0243
H corregida	2.11 p=0.3482	4.409 p=0.1103	8.446 p=0.0147	8.981 p=0.0112	7.461 p=0.024

Prueba U de Mann-Whitney (día 3)

	salina	gp120 VIF	gp120 VIH
salina			
gp120 VIF	Z -1.928 p=0.0539		
gp120 VIH	Z -2.721 p=0.0065		

Prueba U de Mann-Whitney (día 4)

	salina	gp120 VIF	gp120 VIH
salina			
gp120 VIF	Z -2.797 p= 0.0052		
gp120 VIH	Z -2.268 p=0.0233		

Prueba U de Mann-Whitney (día 5)

	Salina	gp120 VIF	gp120 VIH
salina			
gp120 VIF	Z -2.495 p= 0.0122		
gp120 VIH	Z -2.154 p=0.0312		

Tabla 9. En esta tabla presentamos los resultados del análisis a través de la prueba de Kruskal Wallis y la prueba U de Mann-Whitney. En la primera comparación, se indican los valores de p obtenidos por cada día (Kuskal Wallis). En los días 3, 4 y 5, las diferencias fueron significativas. En el día 3 el grupo control solo difiere con el grupo tratado con gp120 de VIH. En tanto que los días 4 y 5 el grupo control difiere con ambos grupos tratados con gp120.

De acuerdo a los resultados, la gp120 interfiere de manera dosis dependiente con la adquisición de la tarea de prevención pasiva, y la dosis de gp120 que muestra un deterioro significativo es de 700 ng. Esto nos podría llevar a pensar que la actividad motora pueda estar deteriorada y estar involucrada en la adquisición de esta tarea. De acuerdo al análisis de la latencia de escape, no existieron diferencias significativas cuando las ratas pasaron del compartimiento de castigo al compartimiento de seguridad durante la administración del choque. Debido a que esta conducta de escape involucra la activación motora, y esta no fue diferente, probablemente el aparente déficit motor observado en la adquisición no interfiera con la capacidad del animal para aprender esta tarea. Los resultados indican que la retención de la memoria se ve deteriorada en los grupos que recibieron 350 ng (día 5) y 700 ng (día 3, 4 y 5). Estos resultados nuevamente indican un efecto dosis-respuesta de la gp120 en la retención de la tarea. Debido a que el efecto es mas consistente en el grupo tratado con 700 ng, decidimos utilizar esta dosis para el resto de los estudios mencionados en esta tesis.

2.4.2 METODO GENERAL EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

En total utilizamos ciento dos ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 gr. para este estudio. Veintiséis ratas fueron implantadas bajo anestesia general con halotano (3-4%) con electrodos para el registro convencional de sueño. El conjunto de electrodos consistió en uno dirigido al hueso frontal para referencia tierra, y uno sobre cada hueso parietal para el registro del electroencefalograma (EEG). Dos electrodos fueron dirigidos a la masa muscular del cuello de la rata para el registro de la actividad muscular. Al mismo tiempo, una cánula guía (gauge 23 x 1 mm de largo) dirigida al ventrículo lateral (P:-0.8 mm, L:1.6mm, V:3.4mm) fue implantada de acuerdo a las coordenadas en el atlas estereotáxico para rata de Paxinos y Watson (1986).

Por otra parte, setenta y seis ratas fueron implantadas solo con una cánula guía dirigida al ventrículo lateral para los protocolos de actividad locomotora y de equilibrio (prueba de Drucker), electrofisiología del hipocampo (LTP) y determinación de AMPc. Después de la cirugía todos los animales recibieron antibiótico y analgésico (penicilina benzatínica 200,000 IU/kg y dipirona 30 mg/kg) y fueron mantenidas individualmente en sus cajas por siete días antes del comienzo de los tratamientos o pruebas de conducta. El ciclo luz-obscuridad fue controlado (12:12, luz prendida a las 9:00 a.m.) y las ratas recibieron agua y alimento *ad libitum* durante todo el experimento.

2.4.3. TRATAMIENTO CON VIH-gp120 O VIF-gp120

Para cada experimento conductual y electrofisiológico se formaron cuatro grupos de ratas cada uno. Dos de ellos fueron tratados ya sea con gp120 del VIH o gp120 del VIF con el siguiente esquema: 140 ng de gp120 en un volumen de 5µl. mismo que fue administrado durante 5 minutos por vía intracerebroventricular (ICV). Este procedimiento se repitió

cada 24 h por cinco días, por tanto, la dosis total final fue de 700 ng. Los otros dos grupos que se utilizaron como grupos controles y fueron tratados con solución salina (NaCl 0.9%) o con gp120 hervida derivada del VIH. La razón de este grupo tratado con gp120-VIH hervida fue de utilizarlo como un control adicional, ya que experimentos previos (Prospéro-García y cols., 1994; Prospéro-García y cols., 1999) indican que cuando la gp120-VIH se hierve por 50 minutos pierde sus propiedades neurotóxicas.

La gp120 del VIH proviene de la cepa SF2 del VIH, donado por la Dra. Nancy Haigwood. Su pureza es mayor del 95% después de un análisis de electroforesis.

La gp120 del VIF fue obtenida en el laboratorio del Dr. John H. Elder, usando cromatografía de lentil lectina a partir del sobrenadante de la suspensión TN-5-JE obtenida de un cultivo de células de insecto que estaban expresando la secuencia que codifica la gp120 del VIF introducida a través de un baculovirus (Baculogold, Pharmingen) a través de la recombinación del vector BluBac II (Invitrogen) entre los sitios de clonación NheI y BamHI. La pureza (70%) fue ensayada usando el análisis SDS-PAGE, y las proteínas se determinaron por el ensayo de Lowry.

2.4.4 LABERINTO CIRCULAR DE BARNES

El laberinto circular de Barnes (figura 14) diseñado para diferenciar entre una tarea contextual y espacial (Barnes, 1979; Barnes y cols., 1989; Bach y cols, 1995; McLay 1999) es un disco hecho de madera de 1.50 m de diámetro y 3.5 cm de grueso, elevado a una altura de 90 cm del suelo. Este disco tiene cuarenta hoyos de 7 cm de diámetro, localizados periféricamente a 5 cm del borde. Asimismo una caja de madera de color negro de 10 cm de ancho, 10 cm de altura y 30 cm de largo, fue usada como lugar de

escape y colocada en uno de los cuarenta hoyos elegido en forma aleatoria. Este laberinto está colocado en el centro de un cuarto de 3 por 3 metros provisto de una cámara de filmación, una videocasetera y una televisión que almismo tiempo sirven como puntos de referencia para que el animal aprenda a localizar el tunel de escape. Sobre el laberinto de Barnes existe una bocina y lamparas de luz blanca. Asimismo una unidad electrónica para producir ruido de 90 decibeles esta conectada a la bocina. Ambos estímulos, la luz y el ruido, fueron usados como estímulos aversivos.

DISEÑO DEL LABERINTO ESPACIAL DE BARNES

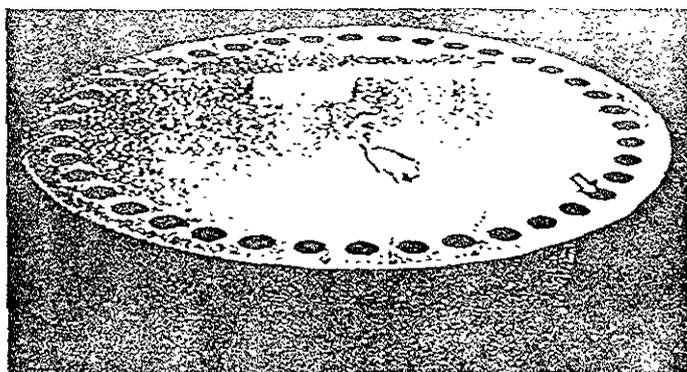


Figura 14: En esta figura se representa el laberinto circular de Barnes (ver texto anterior). Es un disco con 40 agujeros y uno de ellos tiene por debajo un tunel de escape, que permite al animal escapar de los estímulos aversivos (luz intensa y ruido). Este laberinto se encuentra en el centro de un cuarto que el mismo tiempo tiene varias señales que sirven al animal como puntos de referencia y localizar el tunel de escape.

Los parámetros medidos se muestran en la siguiente esquema:

Rata	Tiempo (seg)	No. Errores	Perseverancia	Exploración Aleatoria	ESTRATEGIA		Distancia
					Serial	Espacial	

El tiempo es la cantidad en segundos que la rata ocupa para llegar desde el centro del laberinto al túnel de escape. El No. de errores son los agujeros diferentes al de escape. La perseverancia es el número de veces que la rata explora un mismo agujero. La forma en que la rata encuentra el túnel de escape se define como ejecución aleatoria o estratégica. Cuando es aleatoria, el animal explora en forma indistinta los diferentes agujeros sin

seguir un patrón definido o estrategia. El número de cruces al centro del laberinto es alto y por lo regular se observa esta conducta en las primeras sesiones de adquisición. La estrategia serial consiste en llegar a un agujero y a partir de éste, ir explorando uno por uno hasta encontrar el agujero de escape; esta estrategia permite disminuir el tiempo para escapar. Cuando el animal está en este nivel el número de cruces en el centro disminuye y por lo regular esta conducta se presenta en las sesiones intermedias. La estrategia espacial es una forma mucho más rápida y directa para encontrar el túnel de escape. En esta estrategia, la rata utiliza las señales externas para localizar el túnel de escape, por tanto, se considera que una rata utiliza esta estrategia cuando llega directamente al túnel o a cualquiera de los tres agujeros adyacentes al túnel de escape. Se ha establecido que esta estrategia está relacionada a la función hipocámpal y por lo tanto evalúa la memoria espacial (Barnes, 1979; Barnes y cols., 1989; Bach y cols, 1995; McLay 1999) y por lo regular se presenta en las últimas sesiones de entrenamiento. La distancia es el agujero más distante explorado por la rata antes de llegar al túnel de escape. Se mide por el número de agujeros que separan al agujero más distante explorado durante el ensayo y el túnel de escape (Barnes, 1979).

ALEATORIO

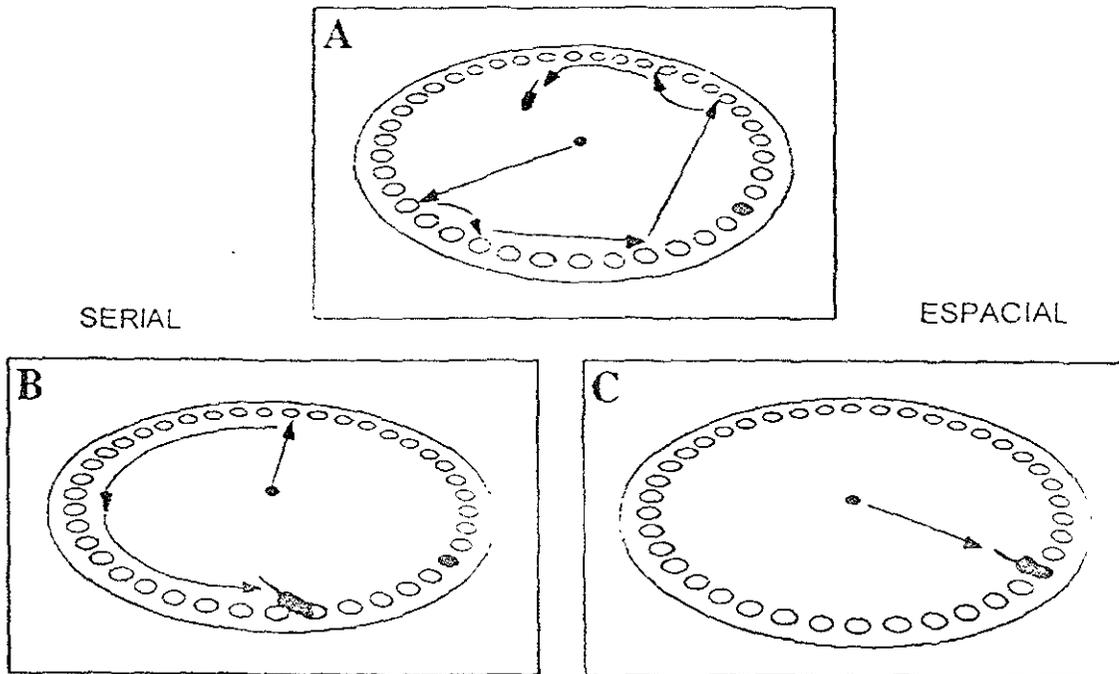


Figura 15: Como se describió en el texto, existen tres formas en que el animal encuentra el túnel de escape. En A se ejemplifica el patrón aleatorio, en B la estrategia serial y en C la estrategia espacial. En estadios tempranos se usa la forma aleatoria para encontrar el túnel de escape, y a medida de que el sujeto avanza en el número de sesiones, cambia a una estrategia mas eficiente que es la serial y por ultimo la espacial (Barnes, 1979).

El procedimiento consiste primero en poner a la rata en la caja negra colocada en el agujero de escape elegido aleatoriamente por un minuto en ausencia del ruido aversivo. pero con la luz encendida. Se le permite a la rata explorar libremente por espacio de 1 minuto. Posterior a esto, la rata es regresada a su caja e inmediatamente después (un minuto) es colocada dentro de un cilindro de metal de 18 cm de diámetro y 35 cm de alto en el centro del disco. Seguido a esto, el ruido es encendido y después de 10 segundos, se remueve el cilindro, permitiendo a la rata explorar el laberinto. Se cuenta 240 s como tiempo límite máximo para permitir a la rata explorar y encontrar el túnel de escape, en caso contrario, la rata es retirada y se repite nuevamente la habituación. Si la rata alcanza el túnel en un periodo menor a 240 s se le retira a su jaula y se cuantifica el tiempo y se

espera un periodo de 20 minutos para el siguiente ensayo. El número de ensayos para cada rata es de 4 al día por cinco días, acumulando un total de 20 al final de la prueba. Para este estudio, se utilizaron veintiséis ratas que fueron divididas de la siguiente manera: VIF-gp120 (n=7), VIH-gp120 (n=7), NaCl (n=6) y VIH-gp120 hervida (n=6).

2.4.5. POTENCIACION DE LARGO PLAZO

Veintiún ratas fueron asignadas aleatoriamente en cada uno de los cuatro grupos. Uno de los grupos recibió la gp120 derivada del VIH, el segundo la gp120 del VIF y el tercer grupo recibió el NaCl y el cuarto recibió gp120 del VIH hervida. La dosis de administración fue la misma previamente explicada.

Preparación in vivo : Dos días después de haber terminado el tratamiento las ratas fueron preparadas para el estudio *in vivo* del hipocampo (figura 16). Para esto, las ratas fueron anestesiadas con halotano (3.0-4.0%), y traqueotomizadas para ventilación pulmonar asistida. Al mismo tiempo fueron colocadas en el aparato estereotáxico para el experimento. La temperatura fue monitoreada por un sensor rectal y mantenida por retroalimentación negativa a 37.0 ± 0.1 °C por un termorregulador electrónico. Una vez que la rata fue colocada en el estereotáxico, el cráneo fue expuesto a través de una incisión media sobre la piel, previamente esterilizado con benzal. Se realizaron dos perforaciones con la ayuda de una fresa dental. La duramadre fue cuidadosamente disecada para facilitar la colocación del electrodo de estimulación y de la micropipeta de registro. Las coordenadas para colocar el electrodo de estimulación fueron las usadas para la corteza entorhinal (bregma: -8.1 mm, L: 4.2 mm y V: 3.0 mm). La micropipeta de registro fue dirigida a la región hiliar del giro dentado (bregma: -4.0 mm, L: 2.5 mm y V: 2.6-3.6 mm). La anestesia con halotano fue ajustada a 1.0 % después de la cirugía y

mantenida a este nivel durante todo el experimento. Los potenciales de campo evocados fueron registrados con la micropipeta antes descrita, llena con azul de pontamina.

Estimulación y registro: Pulsos cuadrados de corriente constante (0.4 mA; 0.15 ms de duración; frecuencia promedio a 0.1 Hz) fueron generados por un generador de corriente Grass PSIU6 controlado por un generador de pulsos AMPI MASTER 8. Los potenciales de campo fueron generados en el giro dentado por estimulación de la vía perforante a través de un electrodo bipolar. El registro de las espigas poblacionales (EP) fue el indicador para la correcta posición de la pipeta de registro dentro de la capa granular del giro dentado. Los potenciales evocados fueron colectados y procesados posteriormente con el uso del programa de software LabVIEW en una computadora Macintosh.

Función entrada/salida (corriente/voltaje). La respuesta poblacional del hipocampo fue inducida por la aplicación de corriente a diferentes intensidades a partir de 0.2 a 0.8 mA con frecuencia de 0.03 Hz. Se determinó la mínima intensidad (umbral) a la cual se obtiene una mínima amplitud de la espiga poblacional (5 mV), la máxima intensidad a la que obtiene la máxima respuesta poblacional y por último, se calcula entre estas dos la intensidad requerida a la cual se obtiene una amplitud media. De esto, se deriva la curva corriente/voltaje.

Protocolo de pulsos pareados (inhibición/potenciación/inhibición): La respuesta del giro dentado ante la aplicación de dos estímulos contiguos separados por un intervalo interpulso de tiempo de 20 a 10000 milisegundos fue estudiada para ver los cambios de excitabilidad inhibición/potenciación/inhibición.

Potenciación de largo plazo (LTP): Para inducir la LTP en la rata anestesiada, se dieron diez trenes de estimulación (cada uno consistiendo de cinco pulsos a 400 Hz). La

intensidad de estimulación fue ajustada para dar del 50 % de la amplitud máxima de la espiga poblacional. Los resultados fueron comparados entre los cuatro grupos. En la siguiente figura vemos el diseño para el estudio de la excitabilidad del hipocampo.

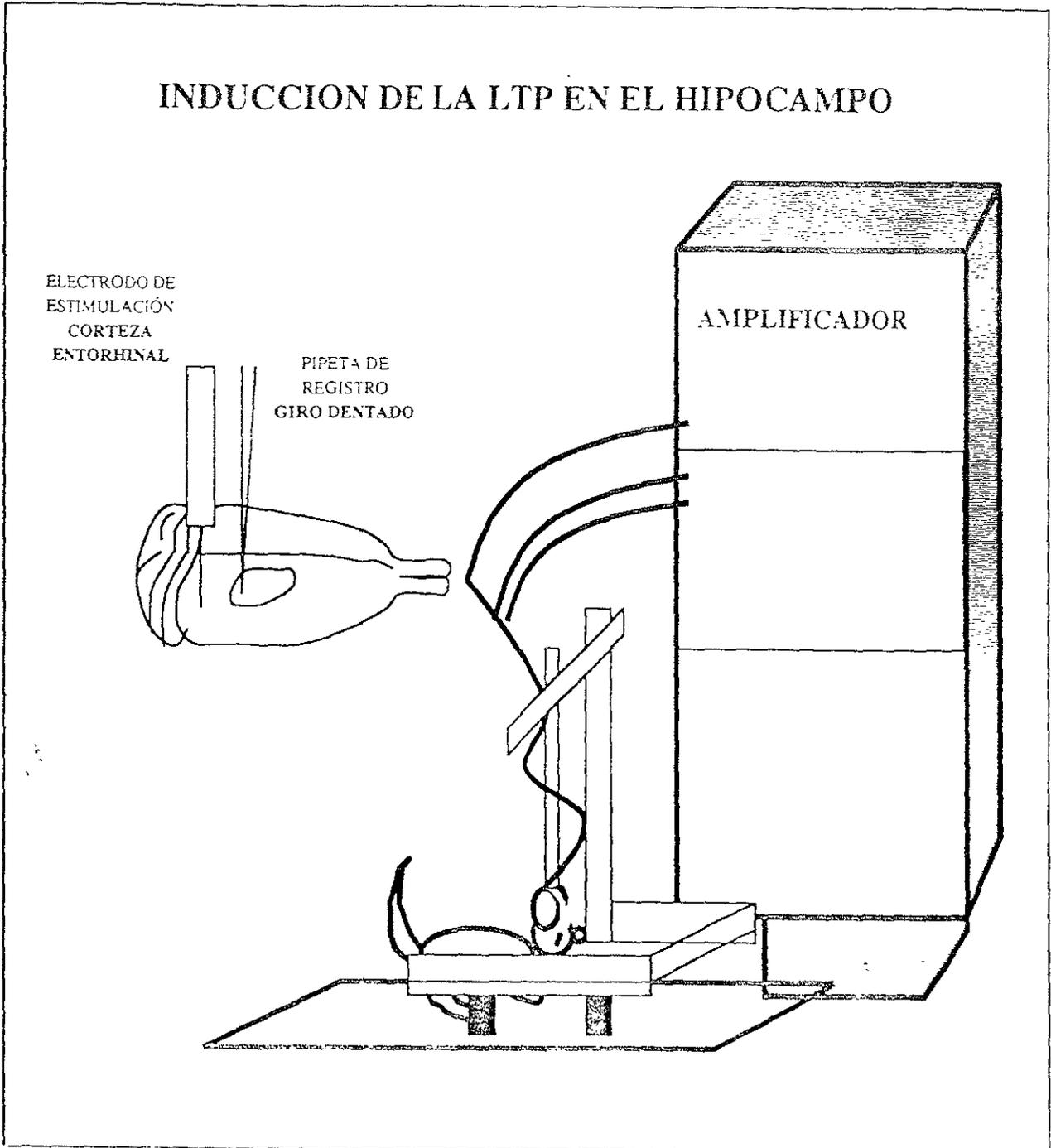


Figura 16 Esta figura representa el equipo utilizado para el estudio electrofisiológico del hipocampo. Este consta de un equipo de aplicación de señales eléctricas que provienen del hipocampo de un animal anestesiado colocado en el estereotáxico. En el extremo superior izquierdo se muestran las pipetas de registro y de estimulación colocadas en el giro dentado y corteza entorhinal respectivamente.

Los datos fueron obtenidos de los cálculos de la amplitud de las EP evocadas, y luego expresadas como promedio \pm error estándar de la amplitud expresada en voltios. Estos resultados fueron comparados pre- y post-tétanos.

Los tiempos evaluados fueron durante cinco minutos antes de la inducción (registro basal), así como 1, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos después de la inducción tetánica.

2.4.6 ENSAYO BIOQUIMICO PARA LA DETECCION DE AMPc EN HIPOCAMPO

Se utilizaron veintiún ratas en este estudio. Estas ratas que fueron implantadas con una cánula en el ventrículo lateral y fueron asignadas aleatoriamente a un grupo para recibir una inyección ICV de: NaCl (n=9), gp120-VIH hervida (n=6), ó gp120-VIH (n=6), de acuerdo a la tasa y dosis de administración previamente explicada. Al final de este tratamiento, las ratas fueron sacrificadas y el hipocampo fue disecado. Ambos hipocampos de tres ratas del grupo que recibió NaCl fueron incubados con forskolina (Fk) a concentración 10 mM, y los hipocampos de las otras tres ratas fueron incubadas con el vehículo para forskolina (ethanol (ETOH) al 10%) y los hipocampos de las tres restantes no recibió ningún tratamiento.

Los hipocampos de las ratas tratadas con gp120-VIH (n=6) o gp120-HIV hervida (n=6) fueron tratados con forskolina (n=3) o bien, no recibieron ningún tratamiento (n=3), en cada grupo. Después de 30 minutos de incubación, los tejidos fueron congelados y almacenados a -20°C . Posteriormente, los tejidos fueron homogeneizados con ácido tricloroacético al 6 % (w/v) y centrifugados a 2000 RPM/15 min a 4°C . La fase soluble fue recolectada y lavada cinco veces con una solución con dietilether. El volumen final fue liofilizado a -60°C y es separado en diferentes viales para su uso posterior. El AMPc

fue medido usando una técnica de inmunohistoquímica para AMPc (Amersham, RPN 225) de acuerdo a las indicaciones de esta compañía. A las muestras se les adiciona 100 µl de IgG anti-AMPc. Después de dos horas de incubación a 4°C, los viales son lavados y la IgG unida es medida a través de la incubación por una hora con una peroxidasa anti-IgG conjugada con un anticuerpo secundario (50 µl en cada vial). La actividad enzimática fue medida después de la incubación con 150 µl de 3,3',5,5', tetrametilbenzidina (TMB) a temperatura ambiente. La reacción es cuantificada en un lector de Elisa a 450 nm. La concentración del AMPc fue calculada como inverso del %: $B/B_0 = \text{muestra-PNE}/B_0\text{-PNE} * 100$ y expresada en femtomoles.

2.4.7 ESTUDIO DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA

Las mismas veintiséis ratas que fueron evaluadas en el laberinto de Barnes fueron utilizadas para el estudio del ciclo sueño-vigilia (figura 17). Estos animales fueron habituados en las condiciones de registro por 24 h, y posteriormente, registradas continuamente por otras 24 h. Para esto se utilizó un polígrafo (amplificador Grass AC) para el registro del electroencefalograma (EEG). La actividad fue filtrada a 1-100 Hz y los trazos del EEG y de la actividad muscular impresos en el papel (velocidad 5mm = 1 seg) fueron evaluados visualmente para determinar los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia. Se determinaron los siguientes estados: vigilia (V), sueño de ondas lentas 1 (SOL1), sueño de ondas lentas 2 (SOL2) y sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). El tiempo total en cada estado, así como su frecuencia, fue determinada en periodos de cuatro horas.

REGISTRO DE SUEÑO-VIGILIA (24 HORAS)

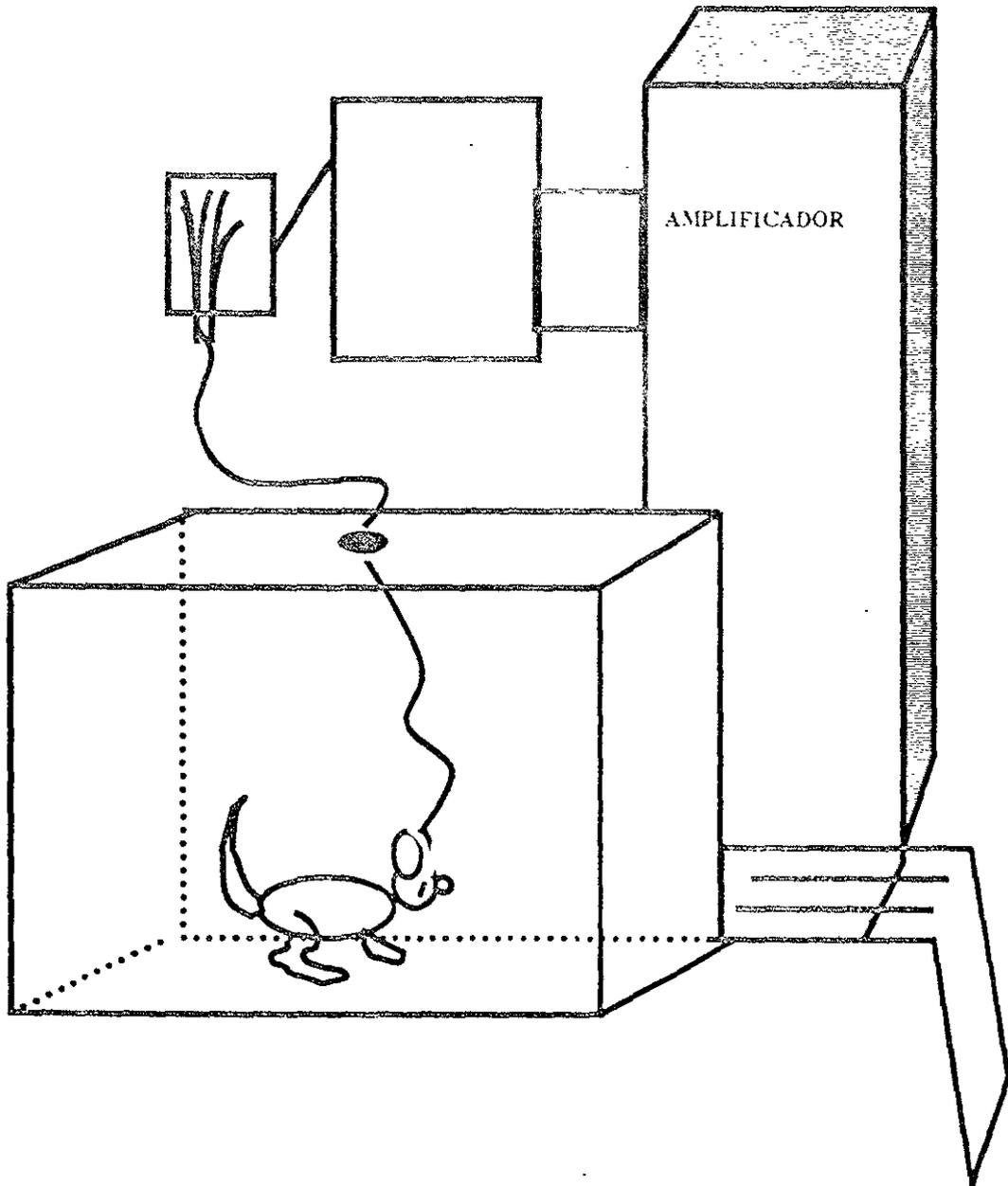


Figura 17: En esta figura se representa el equipo para el registro de sueño. Como podemos observar, el animal es puesto en su propia caja y es conectado al sistema de amplificación. Este equipo está en un cuarto aislado con ciclo de luz-oscuridad de 12:12, donde las luces se prenden a las 9:00 de la mañana. Los registros son recolectados en papel para posteriormente ser leídos visualmente.

2.4.8 ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTANEA

Un día después del estudio de sueño, la actividad locomotora espontánea de estos animales fue evaluada cumulativamente en 10 minutos. Para esto, se utilizó una caja de acrílico oscura de 50 x 50 x 21 cm, provista de 32 fotosensores dentro de ella. Los movimientos son monitoreados cada vez que la rata incide sobre los rayos infrarrojos que cada fotosensor proyecta. Esto es llevado a un transductor que digitaliza la señal y la expresa en cuentas por minuto.

2.4.9 PRUEBA ACTIVIDAD LOCOMOTORA INDUCIDA Y DE EQUILIBRIO (TAREA DE DRUCKER)

Para este experimento se utilizaron 34 ratas. Esta es una tarea locomotora más compleja, ya que involucra el equilibrio (figura 18) y la motivación de la rata para llegar a su propia caja (Drucker-Colín, 1991). El aparato consiste de cinco vigas individuales de 2 m de largo y de diferentes grosores que son 24, 12, 6, 3 y 1 mm, sostenida por dos pedestales permitiendo una inclinación de 15 °. Cada viga es utilizada individualmente y en forma alterna. En el lado mas elevado se coloca la caja de la rata, en tanto que el lado mas bajo esta suspendido en el vacío. Esta disposición es lo suficientemente estimulante para que la rata busque su caja. Todas las ratas fueron entrenadas para caminar sobre las cinco diferentes vigas, de la mas angosta hasta la más ancha una vez al día por cinco días. La rata es colocada en el lado más bajo y el tiempo en que esta tarda para llegar a su caja es tomado. Una vez que la rata ha alcanzado el criterio de llegar a su caja en un tiempo menor a 60 segundos en la viga mas angosta (3 mm), se inicia el tratamiento ICV durante los siguientes cinco días. Al igual que los tratamiento anteriores, la inyección ICV se realiza una vez al día, pero la evaluación de esta prueba se hace 24 horas después.

PRUEBA LOCOMOTORA DE DRUCKER

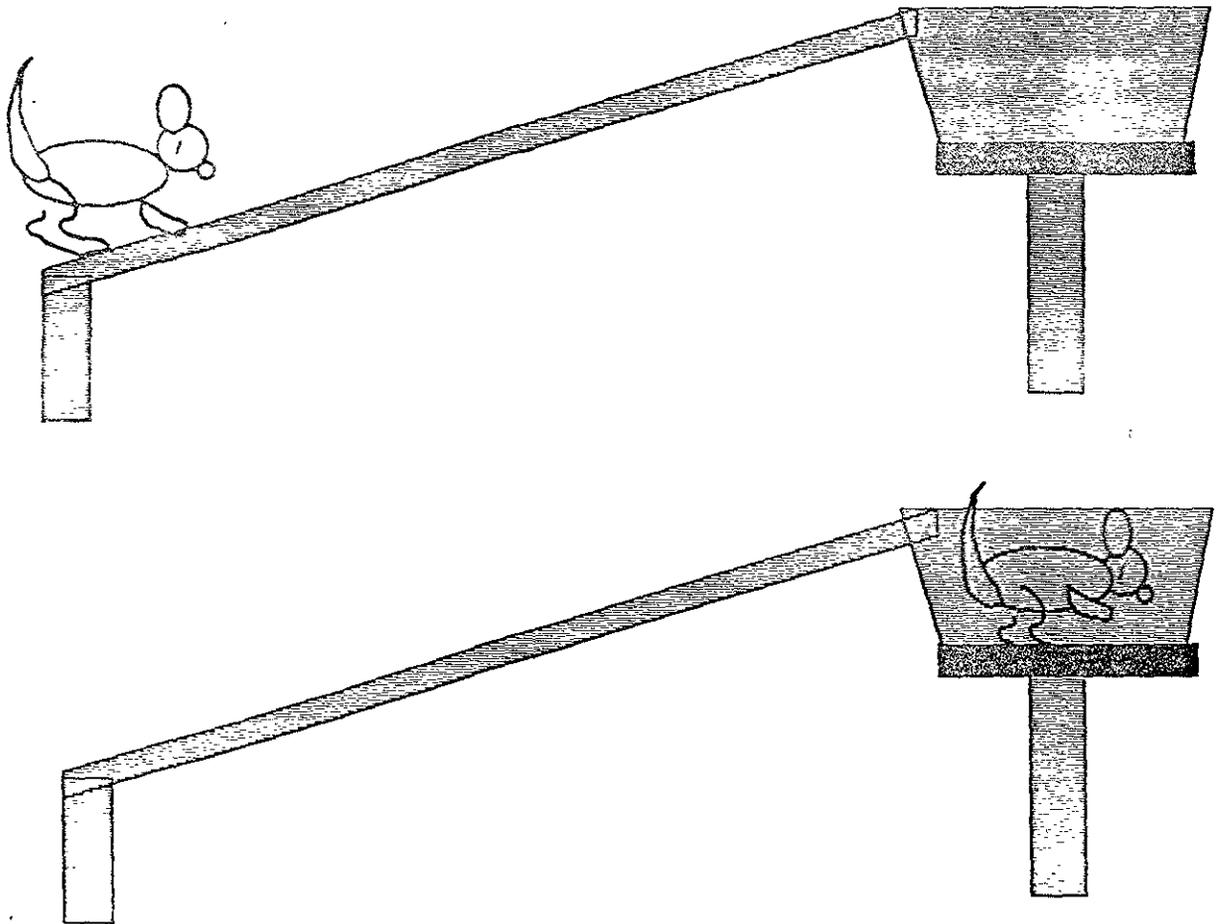


Figura 18: Esta figura muestra la forma en que cada viga es colocada entre dos soportes formando un ángulo de 15 grados. En el extremo superior se coloca la caja de la rata y en el extremo inferior se determina el punto de inicio. La rata es colocada en el extremo inferior y se cuenta el tiempo en que llega a su caja.

2.4.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis del tiempo en la prueba espacial de Barnes se utilizó la estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis y en los casos donde hubo diferencias, se utilizó la prueba pos hoc de Dunn. Para el análisis de la distancia se utilizó la ANOVA, y finalmente para el análisis del porcentaje de ratas que usaron determinada estrategia se utilizó la χ^2 .

En el estudio de LTP, los resultados fueron comparados antes y después de la inducción de la potenciación usando el análisis de varianza en cada punto. Para el análisis sueño, el tiempo total fue expresado cumulativamente en periodos de cuatro horas utilizándose el análisis de varianza. La misma estadística fue usada para el análisis de la actividad locomotora espontánea y la evaluación en la prueba de Drucker, así como para el análisis de la concentración de AMPc. Las significancias estadísticas fueron determinadas usando la prueba post-hoc de Sheffé.

2.4.11 HISTOLOGIAS

Después de terminar los experimentos las ratas fueron anestesiadas y perfundidas con PBS y PBS-paraformaldehído, y el cerebro fue removido y almacenado primero en una solución con sucrosa-PBS a 16% durante 24 horas y luego a otra solución con sucrosa-PBS a 30% durante otras 24 horas para ser cortados en un microtomo en secciones de 50 micras y teñidas con violeta de cresilo para confirmar la localización de la cánula, así como de los electrodos de estimulación y registro.

3 RESULTADOS

3.1 LA gp120 DERIVADA DEL VIH Y DEL VIF CAUSA UN DETERIORO EN LA ADQUISICION DE LA MEMORIA ESPACIAL

Los resultados indican que las ratas tratadas con la gp120 derivada de ambos virus (VIH ó VIF) ocupan mas tiempo para aprender a localizar el túnel de escape en el laberinto de Barnes (ver figura 19). Como podemos observar, ambos grupos tratados con alguna de las gp120 tienen un importante deterioro en la ejecución de la tarea durante las etapas tempranas de aprendizaje que incluyen las primeras 15 sesiones (VIH-gp120) y 9 sesiones (VIF-gp120). El análisis de Kruskal Wallis indica diferencias significativas entre los grupos, y el post-hoc teste de Dunn indica: * $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida. x $p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl. VIH-gp120 hervida y VIF-gp120; la misma diferencia se aplica para VIF-gp120 vs NaCl; + $p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl, VIH-gp120 hervida y VIF-gp120; \$ $p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl.

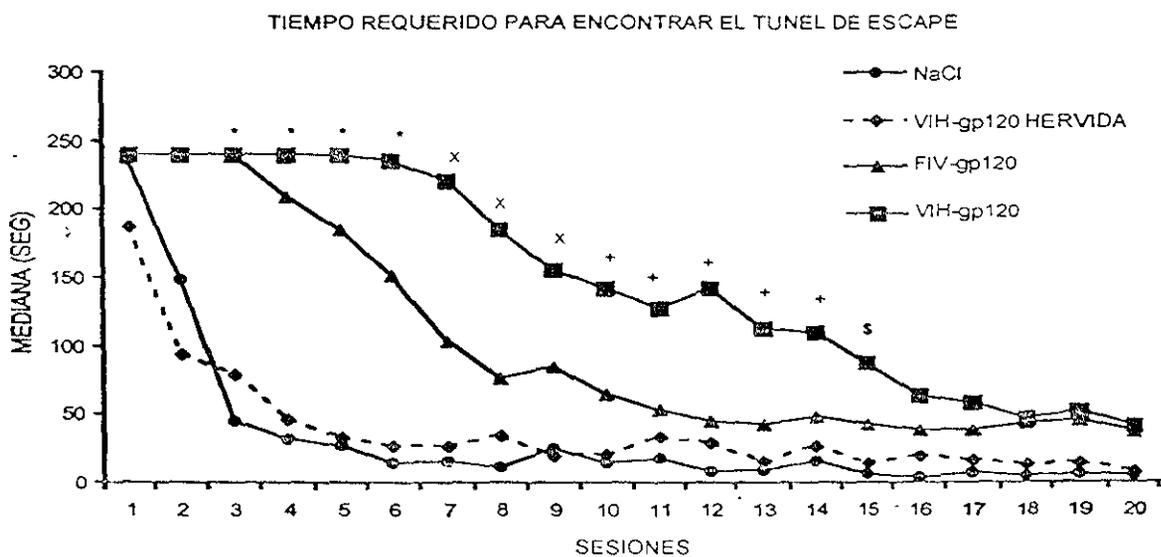


FIGURA 19: En esta figura se muestra la mediana del tiempo que tardaron los sujetos en encontrar el túnel de escape en cada sesión. En la columna vertical, se muestra la mediana del tiempo en segundos, mientras que en la horizontal tenemos el número del ensayo. En total se realizaron 24 ensayos. Las

diferencias son basadas en el análisis con la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (ver tabla 10) y son * $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida; $x p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl, VIH-gp120 hervida y VIF-gp120; la misma diferencia se aplica para VIF-gp120 vs NaCl; + $p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl, VIH-gp120 hervida y VIF-gp120; $S p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl.

a) Prueba de Kruskal Wallis

° de libertad	3									
# de grupos	4									
# de casos	26									
Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H	5.79	6.501	12.323	15.897	17.993	18.21	18.95	14.316	15.92	15.535
p	.1223	.0896	.0064	.0012	.0004	.0004	.0003	.0025	.0012	.0014

Ensayo	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
H	15.57	18.04	15.97	11.82	13.89	7.21	5.19	3.97	5.76	7.12
p	.0014	.0004	.0011	.0003	.0003	.0654	.1583	.2638	.1239	.0679

b) Prueba de Dunn (ensayos 1 a 10)

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NaCl			*	*	*	*				
VIH-gp120 hervida			*	*	*	*				
VIF-gp120							*	*	*	
VIH-gp120							x	x	x	+

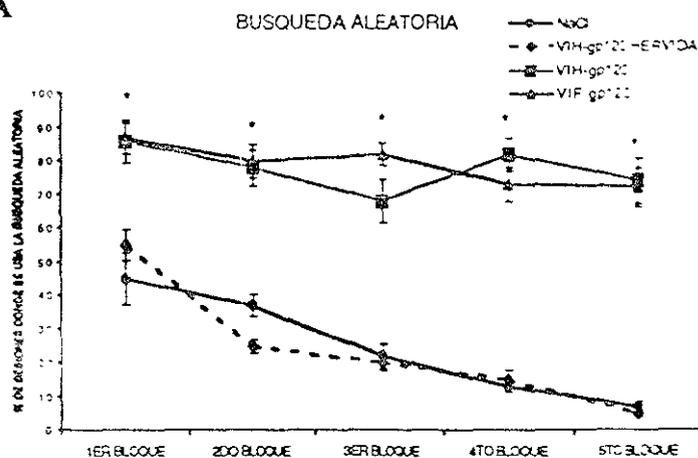
Continuación Prueba de Dunn (ensayos 11 a 20)

Ensayo	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
NaCl										
VIH-gp120 hervida										
VIF-gp120										
VIH-gp120	+	+	+	+	\$					

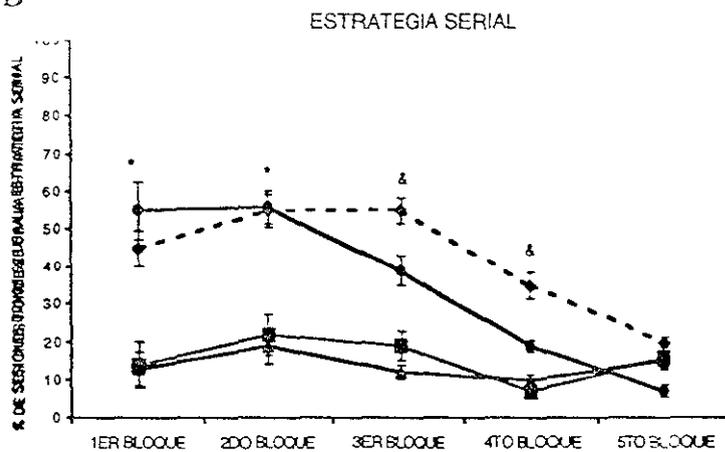
Tabla 10: En esta tabla presentamos los resultados del análisis a través de la prueba de Kruskal Wallis y la prueba pos hoc de Dunn. En a), se indica el valor de grados de libertad (3), número de grupos así como número de casos (26). Debajo de este recuadro se indica el número de ensayo del 1 al 10, seguido del valor de H y el valor de p. En el recuadro b), ilustramos los ensayos 11 al 20. Como se podrá observar, el valor de p fue menor a 0.05 a partir del día 3 hasta el día 15. Por lo que la prueba de Dunn indica * $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida; $x p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl, VIH-gp120 hervida y VIF-gp120; la misma diferencia se aplica para VIF-gp120 vs NaCl; + $p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl, VIH-gp120 hervida y VIF-gp120; $S p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl.

En la figura 20 (A,B y C) mostramos que ambas glicoproteínas tienen un efecto en la capacidad de las ratas en desarrollar una estrategia que le permita encontrar el tunel de escape mas rápido.

A



B



C

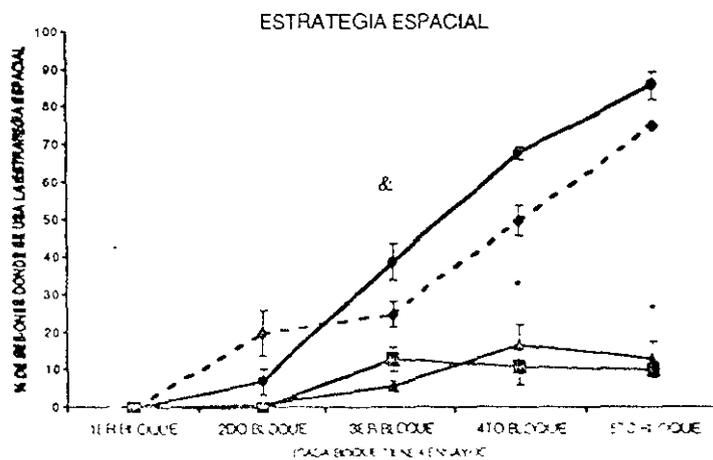


FIGURA 20: En esta figura se muestra el % de ratas que utilizaron la diferentes estrategias para llegar al tunel de escape. En la figura A, B y C se representan la búsqueda aleatoria, la estrategia serial y la espacial respectivamente. Las estrategias fueron representadas por bloques de cuatro ensayos (5 bloques=20 ensayos). En A mostramos que las ratas tratadas con la VIF- y VIH-gp120 usaron en un alto porcentaje la búsqueda aleatoria en todos los ensayos. Aunque los controles tratados con NaCl o VIH-gp120 hervida usaron también esta estrategia en los primeros bloques, la diferencia fue que estos mismos grupos cambiaron a una estrategia mas eficiente (serial o espacial). De acuerdo a Bach y cols, (1995), en todos los casos, * $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida. En B, se podrá observar que las ratas tratadas con la VIH- y VIF-gp120 fueron incapaces de desarrollar una estrategia serial como lo hicieron los grupos controles (* $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida; & $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs VIH-gp120 hervida, y & $p < 0.05$ NaCl vs VIH-gp120). Esto indica que a pesar de que hubo una disminución en el tiempo para encontrar el túnel de escape, la forma de hacer mas eficiente esta búsqueda nunca mejoró en los animales tratados con la VIF- y VIH-gp120. En la grafica C se muestra que los grupos tratados con ambas gp120 tienen un importante deterioro en el desarrollo de la estrategia espacial. Las diferencias son & $p < 0.05$, NaCl vs VIF- y VIH-gp120; * $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y FIV-gp120 hervida.

En la tabla 11 se muestra el análisis estadístico usado en estas estrategias.

a) ESTRATEGIAS

# de DATOS 12	GL:11				
	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bloque 5
Ji cuadrada	362.209	256.504	186.765	246.597	344.202
Probabilidad	.0001	.0001	.0001	.0001	.0001

b) BÚSQUEDA ALEATORIA

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	22
Total	25

Valor de F

Primer bloque	Segundo bloque	Tercer bloque	Cuarto bloque	Quinto bloque
13.05713	47.82303	57.04019	89.06557	73.68594
$p = .0001$	$p = .0001$	$P = .0001$	$p = .0001$	$P = .0001$

Prueba F de Scheffe

	Primer bloque	Segundo bloque	Tercer bloque	Cuarto bloque	Quinto bloque
NaCl	FIV (8.32861) HIV (7.93673)	FIV (18.59226) HIV (16.90297)	FIV (34.04255) HIV (20.00946)	FIV (39.34426) HIV (52.03279)	FIV (34.64535) HIV (36.81017)
VIH-gp120 hervida	FIV (4.8347) HIV (4.5373)	FIV (30.4173) HIV (28.24535)	FIV (36.34988) HIV (21.78723)	FIV (36.76503) HIV (49.06011)	FIV (36.81017) HIV (39.04059)
VIF-gp120					
VIH-gp120					

c) ESTRATEGIA SERIAL

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	22
Total	25

Valor de F

Primer bloque	Segundo bloque	Tercer bloque	Cuarto bloque	Quinto bloque
13.05713	17.76815	32.61396	35.1667	6.31206
p = .0001	p = .0001	P=.0001	p = .0001	P=.053

Prueba F de Scheffe

	Primer bloque	Segundo bloque	Tercer bloque	Cuarto bloque	Quinto bloque
NaCl	FIV (8.32861) HIV (7.93673)	FIV (9.88809) HIV (8.34958)	HIV (5.69801)	HIV (5.3333)	
VIH-gp120 hervida	FIV (4.8347) HIV (4.5373)	FIV (9.36078) HIV (7.86566)	FIV (26.33903) HIV (11.46154)	FIV (23.14815) HIV (29.03704)	
VIF-gp120					
VIH-gp120					

d) ESTRATEGIA ESPACIAL

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	22
Total	25

Valor de F

Primer bloque	Segundo bloque	Tercer bloque	Cuarto bloque	Quinto bloque
		18.5472	58.56574	124.70284
		P=.0001	p = .0001	P=.0001

Prueba F de Scheffe

	Primer bloque	Segundo bloque	Tercer bloque	Cuarto bloque	Quinto bloque
NaCl			FIV (16.06195) HIV (9.9705)	FIV (34.54183) HIV (43.1474)	FIV (68.85013) HIV (74.62532)
VIH-gp120 hervida				FIV (14.4621) HIV (20.1992)	FIV (49.66408) HIV (54.58656)
VIF-gp120					
VIH-gp120					

Tabla 11: En esta tabla presentamos los resultados obtenidos con el uso de ji cuadrada (a), misma que indica diferencias significativas. De acuerdo a Bach y cols, (1995) el uso de ANOVA es sugerida para determinar las diferencias entre los grupos. En b, c y d se representa el análisis de varianza, el valor de F y la prueba F de Scheffe para la búsqueda aleatoria, la estrategia serial y la espacial respectivamente. Para todos los casos, los grados de libertad entre grupos es de 3 y dentro de los grupos 22. El valor de F se indica solamente en los casos donde hubo diferencias significativas. Estas diferencias ya fueron descritas en la figura 20.

Cuando se evalúa la distancia recorrida por las ratas antes de llegar al túnel de escape, encontramos que ambos grupos tratados con la gp120 siguen explorando agujeros que están más distantes al túnel de escape (figura 21).

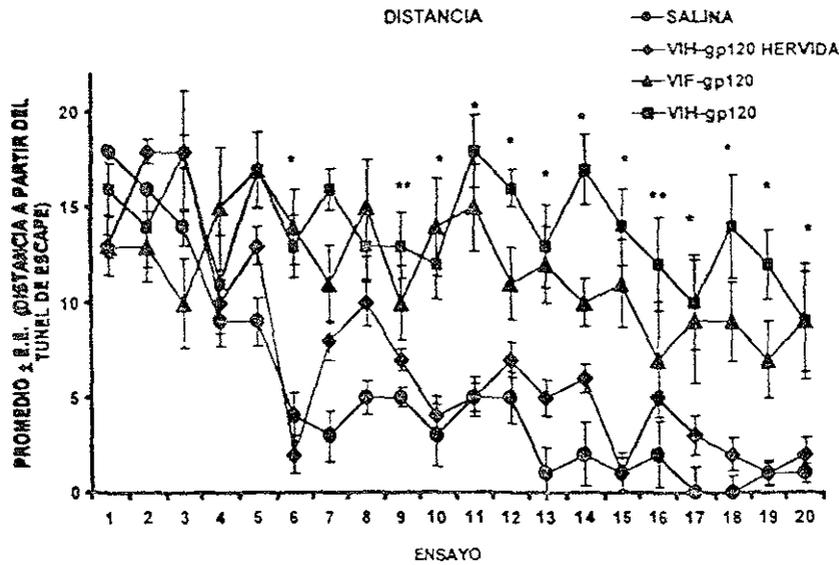


Figura 21: En esta gráfica mostramos los agujeros mas distantes explorados durante la adquisición de la tarea en el laberinto espacial de Barnes. Ambos grupos tratados con la gp120 siguen explorando agujeros distantes aun en las sesiones finales de la adquisición de esta tarea, mientras que los grupos controles mejoran su ejecución y exploran agujeros menos distantes conforme transcurren las sesiones. Los resultados del análisis de varianza se explican en la tabla 11. Las diferencias de los grupos fueron * $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida; ** $p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida.

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	22
Total	25

Valor de F en cada sesión

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Entre grupos	2.4953	2.1627	3.20223	1.35043	5.5313	3.58848	8.32	2.59034	4.87988	26.30117
Dentro de los grupos (p)	.8605	.8837	.0516	.2934	.0084	.0372	.0069	.0889	.0135	.0001

Ensayo	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Entre grupos	7.2617	4.0164	2.18857	18.977	21.89819	3.25747	7.4781	13.977	6.25	13.4991
Dentro de los grupos (p)	.0027	.0262	.1291	.0001	.0001	.0492	.0024	.0001	.0051	.0001

Prueba F de Scheffe

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NaCl												
VIH-gp120 hervida						VIF-gp120 3.5746 VIH-gp120 5.0342				VIF-gp120 15.81 VIH-gp120 8.894	VIF-gp120 4.414 VIH-gp120 4.0127	VIF-gp120 3.817 VIH-gp120 3.5108
VIF-gp120						NaCl 9.2534			NaCl 4.0241	NaCl 17.05	NaCl 3.6586	NaCl 4.589
VIH-gp120						NaCl 7.1247			NaCl 3.1629	NaCl 9.83	NaCl 3.0813	NaCl 3.473

Ensayo	13	14	15	16	17	18	19	20
NaCl								
VIH-gp120 hervida	VIF-gp120 3.4986 VIH-gp120 3.918	VIF-gp120 3.4559 VIH-gp120 9.04335	VIF-gp120 9.934 VIH-gp120 14.305		VIF-gp120 3.1124 VIH-gp120 5.01268	VIF-gp120 4.371 VIH-gp120 7.772	VIF-gp120 6.585 VIH-gp120 5.2478	VIF-gp120 7.794 VIH-gp120 5.2814
VIF-gp120	NaCl 4.2683	NaCl 7.675	NaCl 7.566	NaCl 8.7963	NaCl 3.9867	NaCl 5.71004	NaCl 7.675	NaCl 5.8435
VIH-gp120	NaCl 4.7142	NaCl 15.49	NaCl 11.431	NaCl 11.142	NaCl 4.927	NaCl 9.526	NaCl 4.2920	NaCl 7.2584

Tabla 12: Esta tabla representa el análisis de varianza para la distancia mas lejana recorrida por las ratas durante todas las sesiones en la prueba de Barnes. Para todos los casos, los grados de libertad entre grupos es de 3 y dentro de los grupos 22. El valor de F se indica solamente en los casos donde hubo diferencias significativas. Las diferencias de los grupos fueron * $p < 0.05$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida; ** $p < 0.05$, VIH-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida. Nota: A pesar de que en las sesiones 5, 7 y 8 se indica diferencias significativas, estas solo fueron significativas con el uso de otras pruebas pos hoc como la de Fisher, pero no con la prueba de Scheffe.

3.2 LA LTP ES DETERIORADA POR LA gp120

Las espigas poblacionales (EP) se caracterizaron por un registro negativo superpuesto en el registro de potencial post-sináptico excitatorio (PPSE) poblacional. A continuación mostramos un registro de la curva generada al aplicar una estimulación de mínima intensidad para obtener una EP de 5 mV de amplitud observada en nuestros experimentos (figura 22).

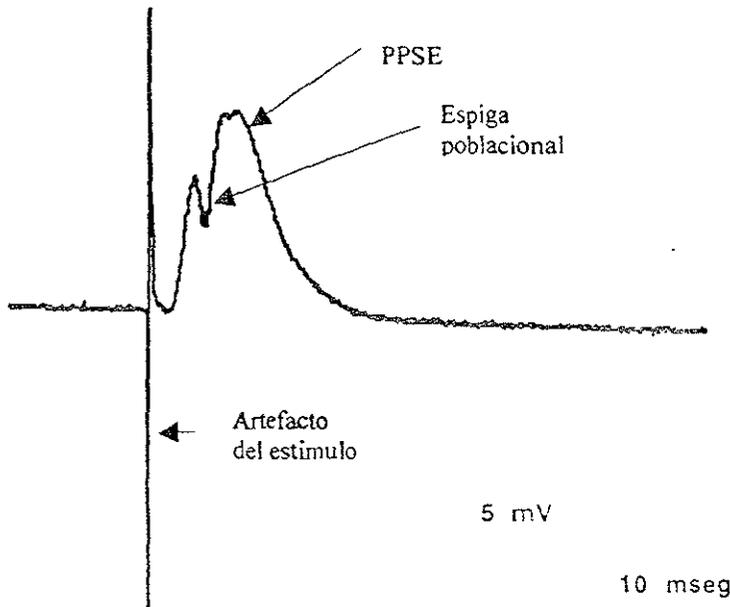


Figura 22: Esta figura muestra el ejemplo de un potencial de campo generado en el giro dentado por estimulación de la vía perforante. El registro de la espiga poblacional fue el indicador para la correcta posición de la pipeta de registro dentro de la capa granular del giro dentado. Esta espiga poblacional está superpuesta en la deflexión del potencial postsináptico excitatorio (PPSE) que surge inmediatamente después del artefacto de estimulación como una deflexión positiva. A su vez, la espiga poblacional surge como una deflexión negativa (ver flechas) de duración breve y representa la suma de potenciales de acción del conjunto de células granulares que han sido excitadas. El voltaje y el tiempo están indicados por la barra horizontal y vertical respectivamente.

La curva corriente-voltaje (figura 23) se refiere a la amplitud alcanzada por la espiga poblacional a estimulaciones de diferente intensidad. Por tanto, mostraremos la intensidad mínima de estimulación (o umbral) que se requiere para alcanzar una amplitud de 5 mV en la espiga poblacional en todas las preparaciones. Asimismo, mostraremos la intensidad máxima requerida para obtener la una amplitud máxima de la espiga poblacional. La intensidad media es el punto intermedio del umbral y de la intensidad máxima. Los resultados indican que no hubo diferencias entre los cuatro grupos estudiados. La intensidad umbral produjo una amplitud similar en la respuesta poblacional de los cuatro grupos. Al aumentar la intensidad para observar

la respuesta máxima, tampoco se observó diferencias significativas. Por tanto, la intensidad para encontrar la amplitud media fue similar en todos los grupos.

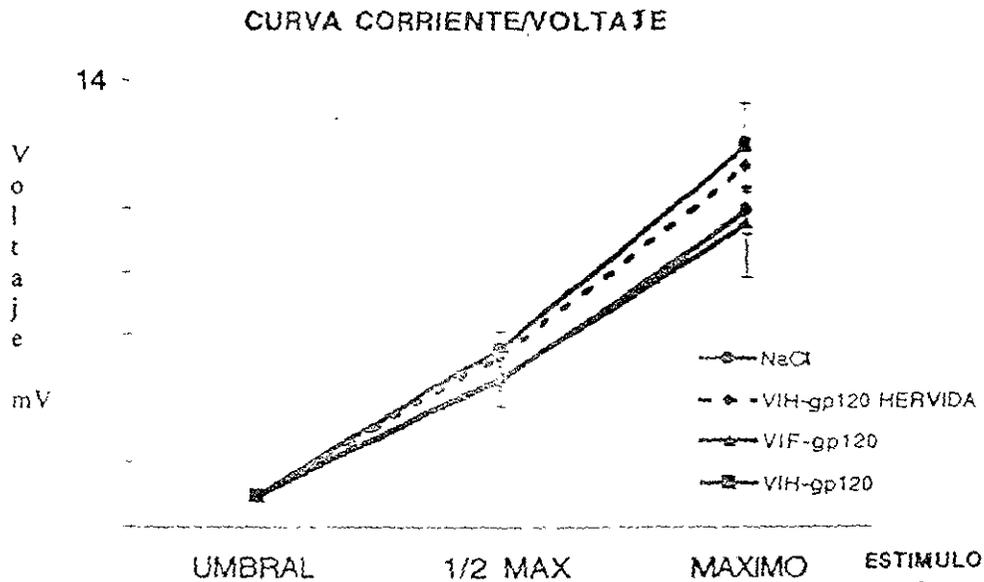


Figura 23: Esta figura muestra la amplitud de la espiga poblacional a diferentes intensidades de estimulación. Podemos observar que la respuesta poblacional a la estimulación umbral, media máxima (1/2 max) y máxima fue similar en todos los casos.

El protocolo de estimulación por pulsos pareados produjo una curva típica de inhibición-potenciación-inhibición en los cuatro grupos, mismos que no tuvieron diferencias significativas. En la figura 24 ilustramos un ejemplo de inhibición donde la separación del primer y segundo estímulo es de 20 milisegundos. Como se podrá observar, la inhibición de la amplitud de la segunda espiga poblacional es significativo a pesar de que la intensidad y frecuencia del estímulo aplicado es el mismo para ambos (ver el trazo A en la siguiente página).

Cuando se aumenta el tiempo del intervalo entre los dos estímulos, observamos que la segunda respuesta está potenciada y se demuestra con el aumento importante de la amplitud de la espiga poblacional (ver trazo B en la siguiente página).

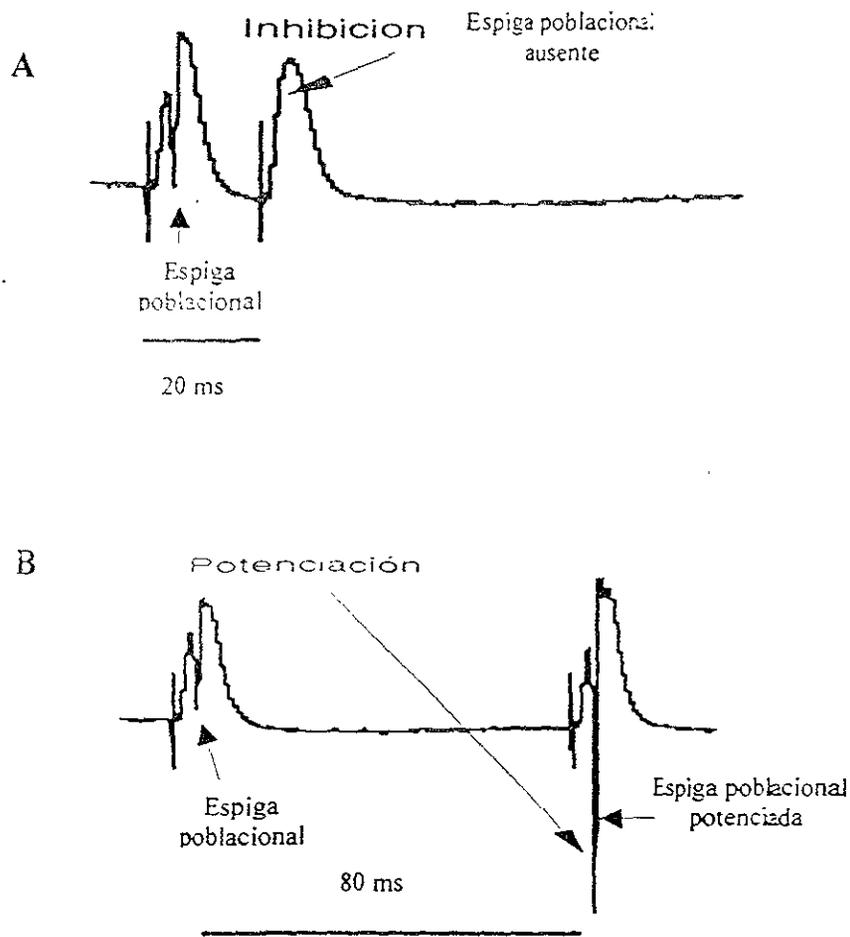


Figura 24: En esta figura mostramos los trazos obtenidos en el protocolo de pulsos pareados. En el registro A se representa la respuesta poblacional cuando hay una separación de los estímulos de 20 ms. Si se observa la primera respuesta, la espiga poblacional está presente, pero la respuesta poblacional al segundo estímulo está ausente. Esto indica inhibición. En B se representa la potenciación de la espiga poblacional cuando el segundo estímulo es aplicado 80 ms después del primero.

Al graficar los resultados obtenidos del protocolo de pulsos pareados (figura 25), tenemos que tanto los grupos tratados con VIF-gp120 y VIH-gp120 como los grupos controles (NaCl y VIH-gp120 hervida) no muestran diferencias significativas en las mediciones realizadas.

PULSOS PAREADOS

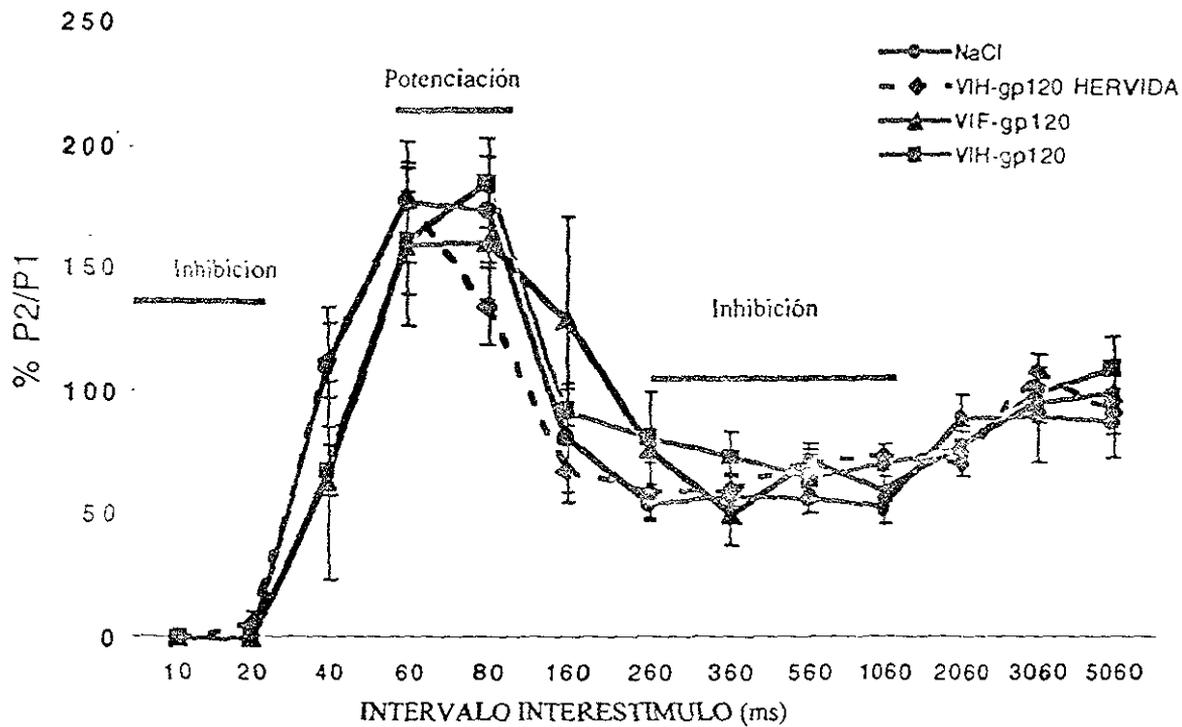


Figura 25: En esta figura demostramos que los cuatro grupos presentaron las mismas características de inhibición-potenciación-inhibición (indicados por las barras). En la columna vertical, graficamos el porcentaje de la diferencia entre la primera y la segunda espiga poblacional, y en el eje horizontal, se representa la separación del primero y el segundo estímulo en ms. Como podemos observar, los cuatro grupos presentan una curva similar, donde primero se observa una inhibición de la respuesta (entre 10 y 20 ms) seguida de una potenciación de la respuesta (60 y 80 ms) y seguida finalmente por inhibición parcial (260 a 1060 ms).

El siguiente protocolo fue la inducción de la potenciación de largo plazo. Para esto, tomamos muestras de la respuesta basal (línea base) durante cinco minutos. Después de esto, aplicamos una estimulación de alta frecuencia o estimulación tetánica que consistió en la administración de diez trenes de estimulación (cada uno consistiendo de cinco pulsos a 400 Hz) para la inducción de la LTP, y nuevamente realizamos mediciones a 1, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos posteriores a la estimulación posttetánica. En la siguiente figura sobreponemos dos ejemplos de dos trazos de los potenciales poblacionales antes (línea base) y después de la inducción de LTP.

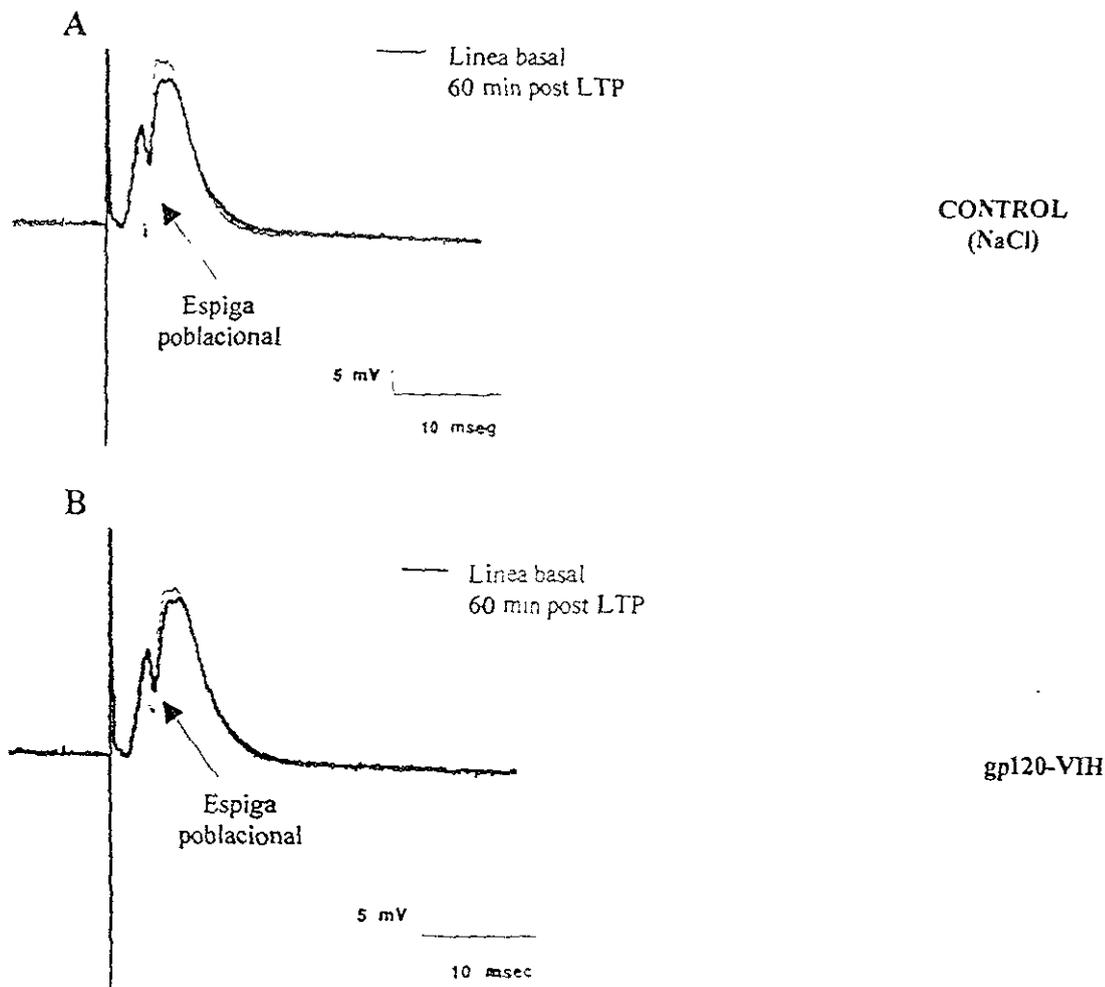


Figura 26: En esta figura mostramos dos trazos interpuestos para ver la diferencia de la amplitud alcanzada por la espiga poblacional antes (línea basal) y después (60 minutos) de la inducción de LTP. En A mostramos el trazo de una rata control tratado con salina y en B mostramos el trazo de una rata tratada con gp120-VIH. Como podemos observar, en A está presente la potenciación de la respuesta, pero en B, el porcentaje de esta respuesta es muy pequeña.

La estimulación tetanizante de la vía perforante en las ratas controles tuvo como efecto la producción de una espiga poblacional robusta (potenciación posttetánica o PTP) de 240% de la línea base en el grupo tratado con NaCl. En tanto que el grupo tratado con VIF-gp120 tuvo un incremento del 120%, el grupo VIH-gp120 cerca del 90%, y el grupo tratado con VIH-gp120 hervida tuvo un incremento cercano al 160% (ver figura 27). En este caso, encontramos

diferencias significativas entre el grupo que fue tratado con NaCl vs los grupos que fueron tratados con VIH-gp120 y VIF-gp120.

Con respecto a la potenciación de largo plazo, ésta fue significativamente deteriorada solo en el grupo tratado con VIH-gp120 pero no en el grupo de VIF-gp120 cuando la amplitud de la espiga poblacional fue evaluada a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos (figura 27).

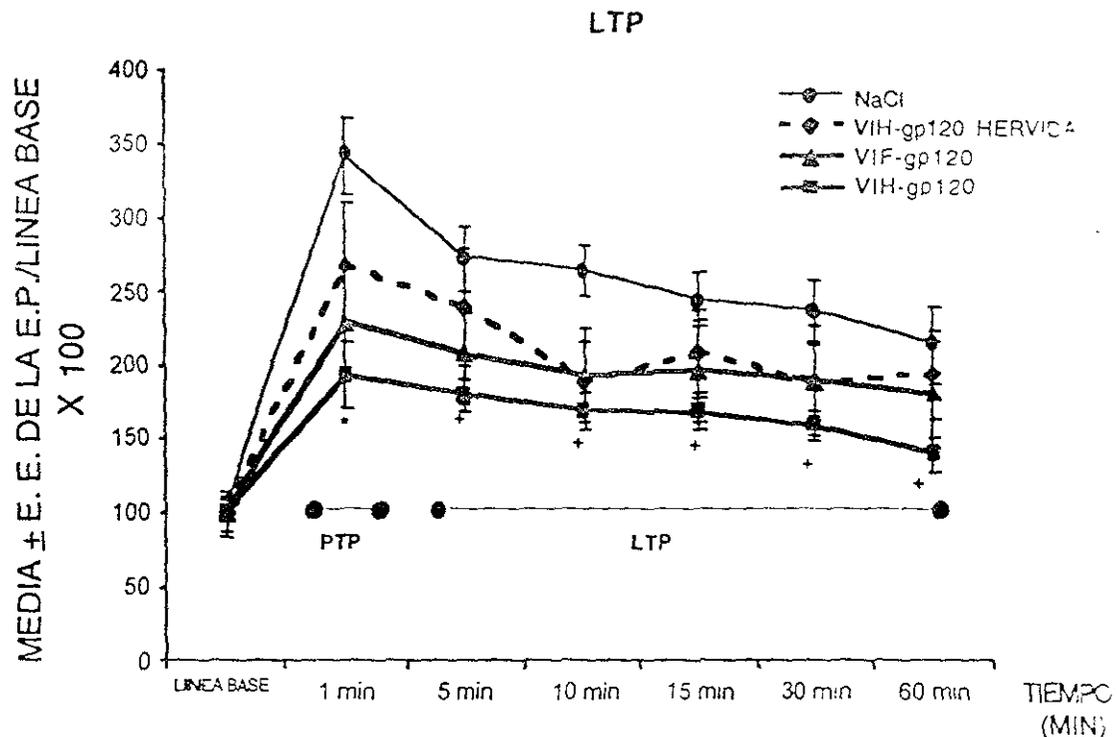


Figura 27: En esta figura, mostramos los efectos de la VIF-gp120 del VIH-gp120 en la potenciación de largo plazo. En la columna vertical indicamos la media de la amplitud \pm E.E. de la espiga poblacional y en la columna horizontal el tiempo. Asimismo, indicamos con una línea debajo de los trazos la potenciación postetánica (PTP) y la potenciación de largo plazo (LTP). Al realizar las comparaciones, encontramos significancias en PTP donde ambos grupos tratados con ambas gp120 difieren con el grupo tratado con salina (* $p < 0.01$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl) en tanto que la LTP estuvo deteriorada solo en el grupo tratado con VIH-gp120 en las evaluaciones hechas a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos (+ $p < 0.05$ VIH-gp120 vs NaCl).

En las siguientes tablas ilustramos el analisis de varianza y la prueba de Scheffe empleada para encontrar las diferencias entre los grupos.

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	17
Total	20

Análisis de Varianza (valor de F)							
Fuente	Línea basal	1 minuto	5 minutos	10 minutos	15 minutos	30 minutos	60 minutos
Entre grupos	1.939	3.354	3.22113	3.39153	3.20691	3.25206	3.3056
Dentro de los grupos	p = 1	p = .0436	p = .0489	p = .0422	p = .0496	p = .0476	p = .0454

Prueba F de Scheffe

tiempo	basal	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
NaCl							
VIH-gp120 herida							
VIF-gp120		5.41 vs NaCl *					
VIH-gp120		18.6125 vs NaCl	14.92 vs NaCl	19.18 vs NaCl	11.78 vs NaCl	10.50 vs NaCl	6.43 vs NaCl

Tabla 13: En esta tabla mostramos el análisis de varianza realizado en cada tiempo (basal, 1, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos), por lo que en cada caso se determinó el valor de F, los grados de libertad y la probabilidad. En los casos donde se encontraron diferencias se realizó la prueba pos hoc de Scheffe, misma que se muestra en la última tabla (prueba F de Scheffe). Como se podrá observar, el análisis de varianza indica diferencias significativas a 1, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. Al realizar la prueba pos hoc, se encontró que 1 minuto después de la inducción de LTP, ambos grupos tratados con ambas gp120 difieren con el grupo tratado con salina (* $p < 0.01$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl) en tanto que la LTP estuvo deteriorada solo en el grupo tratado con VIH-gp120 en las evaluaciones hechas a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos (+ $p < 0.05$ VIH-gp120 vs NaCl).

La administración de cualquiera de las glicoproteínas atenuó esta potenciación y aun más, la inducción de la potenciación de largo plazo (LTP). En la PTP, se observó la siguiente diferencia:

* $p < 0.01$, VIH- y VIF-gp120 vs NaCl. La LTP estuvo deteriorada solo en el grupo tratado con VIH-gp120, en las evaluaciones hechas a los 5, 10, 15, 30 y 60 minutos (+ $p < 0.05$ VIH-gp120 vs NaCl). El primer punto de la curva indica la línea base de la espiga poblacional de cada grupo. El siguiente intervalo representa la PTP y el intervalo más largo representa la LTP.

3.3 LA PRODUCCION DE AMPc ESTA DETERIORADA EN EL GRUPO TRATADO CON VIH-gp120

Una vez que la reacción es cuantificada en el lector de Elisa (a 450 nm de longitud de onda), la densidad óptica (DO) es convertida a porcentaje de unión usando la siguiente ecuación:

$$\% B/B_0 = \frac{DO \text{ de la muestra} - DO \text{ del PNE}}{DO \text{ de la } B_0 - OD \text{ de PNE}} * 100$$

donde: PNE es el *pegado no específico*, DO es la *densidad óptica*, DO de la B_0 es *densidad óptica sin unión de AMPc*. Una vez que nosotros obtenemos la curva de calibración estándar, el siguiente paso es expresar la concentración en fentomolas.

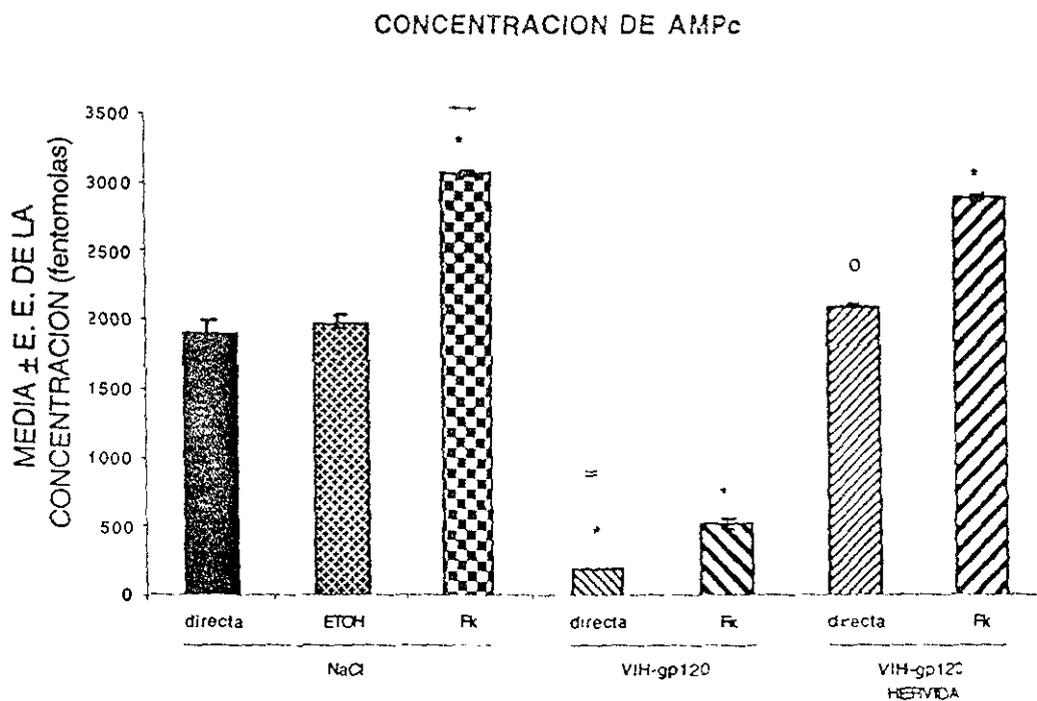


Figura 28: En esta figura mostramos los niveles en fentomolas de AMPc en el hipocampo. En la columna vertical se representa la concentración en fentomolas de AMPc y en las horizontal se representa el tratamiento recibido. Se estudiaron tres grupos, el primero fue tratado con NaCl, el segundo con VIH-gp120 y el tercero con VIH-gp120 hervida. Los hipocampos de los animales tratados con NaCl fueron asignados en tres diferentes subgrupos. En el primero de ellos, la medición del AMPc fue directa, en el segundo, el hipocampo fue incubado con ETOH y el tercero con foscolina (Fk). Los resultados

indican que la Fk induce la producción de AMPc y por lo tanto es un control positivo para nuestros experimentos, y que el ETOH no produce cambios significativos, y en este caso lo utilizamos por ser el vehículo donde se disuelve la Fk. El segundo grupo (VIH-gp120) fue dividido en dos subgrupos, y en el primero de ellos la medición de AMPc fue directa en tanto que el otro grupo, los hipocampos fueron incubados con Fk. En ambos grupos, la producción de AMPc estuvo deteriorada. El tercer grupo fue tratado con VIH-gp120 y fue dividido en dos subgrupos; el primero de ellos, la medición se hizo directa y en el segundo el hipocampo fue incubado con FK.

Análisis de Varianza de la concentración de AMPc				
Fuente	grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado promedio	F-test:
Entre grupos	6	5.59193	9319877.61186	449.16306
Dentro de los grupos	47	975223.22075	20749.43023	p = .0001
Total	53	5.68945		

Prueba de Scheffe

	NaCl	ETOH	Forscolina	VIH-gp120	VIH-gp120 + Fk	VIH-gp120 hervida	VIH-gp120 hervida Fk
NaCl							
ETOH							
Forscolina	44.86262	38.3901					
VIH-gp120	93.26231	103.209	267.4924				
VIH-gp120 + Fk	59.30267	67.2857	207.3248	3.8275			
VIH-gp120 hervida			28.28258	109.8824	73.8294		
VIH-gp120 hervida + Fk	30.0836	24.99909		219.47	167.04411	17.59455	

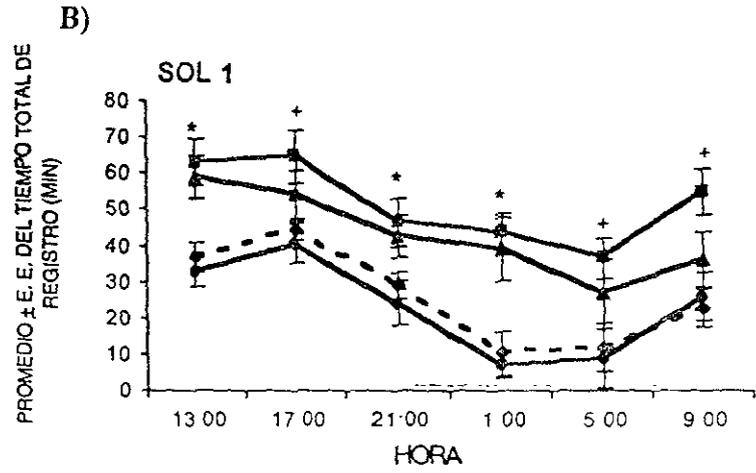
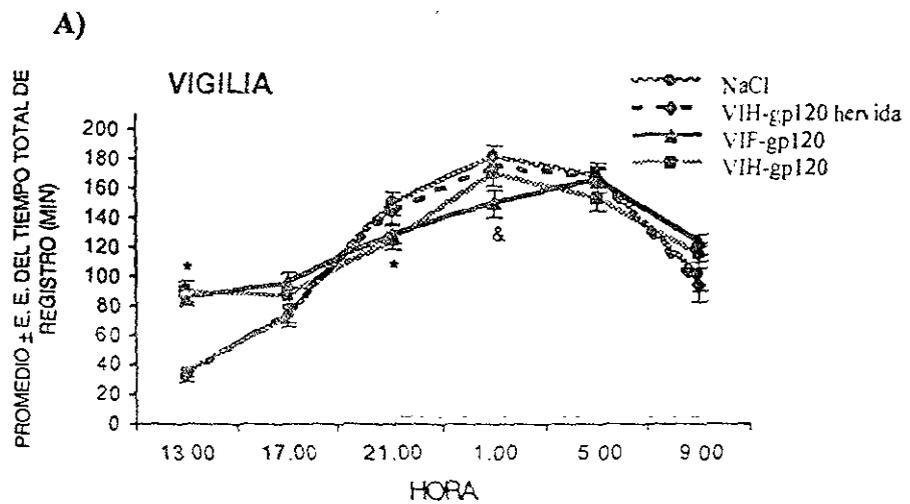
Tabla 14: En esta tabla mostramos el análisis de varianza de la concentración de AMPc. El valor de p indica diferencias significativas, por lo que al análisis pos hoc con la prueba de Scheffe encontramos que * $p < 0.01$, donde NaCl y ETOH son diferentes a los grupos tratados con Forscolina, VIH-gp120, VIH-gp120 + Fk y VIH-gp120 hervida + Fk; ++ $p < 0.01$, donde Forscolina es diferente a los grupos tratados con VIH-gp120, VIH-gp120 + Fk y VIH-gp120 hervida; = $p < 0.01$, donde VIH-gp120 es diferente a VIH-gp120 + Fk, VIH-gp120 hervida y VIH-gp120 hervida + Fk; o $p < 0.01$, donde VIH-gp120 hervida es diferente a VIH-gp120 + Fk

Los resultados indican que la producción de AMPc estuvo deteriorada en el hipocampo cuando se administró la VIH-gp120 por vía ICV. En contraste, como se podrá observar, las concentraciones basales del AMPc no se ven modificadas al administrar VIH-gp120 hervida ni con la incubación con ETOH (vehículo para forscolina). Cuando se agrega Fk a un grupo control tratado con NaCl, o a un grupo tratado con VIH-gp120 hervida, se observa un aumento considerable en la producción de AMPc, el cual es significativamente diferente a la producción basal del grupo control. Cuando se hace la medición de la concentración de AMPc en el grupo tratado con VIH-gp120 se observa un deterioro significativo en la producción basal y más aun, la inducción con Fk no tiene efecto significativo en los niveles AMPc (ANOVA * $p < 0.05$).

3.4 EL CICLO SUEÑO-VIGILIA ESTA ALTERADO POR LA ADMINISTRACION TANTO DE LA VIF-gp120 COMO DE LA VIH-gp120

Los resultados indican que las ratas tratadas con ambas glicoproteínas muestran un aumento en estado de vigilia durante el periodo de luz, cuando normalmente las ratas controles están dormidas y en caso contrario, muestran una disminución del estado de alerta en el periodo de obscuridad, cuando las ratas controles tienen el máximo nivel de vigilia. Asimismo, el grupo HIV-gp120 presentó un incremento significativo del SOL1 durante todas las 24 horas de registro, en tanto que el grupo VIF-gp120 mostró un incremento solamente a las 13:00, 21:00 y 01:00 horas. A su vez, la evaluación del SOL2 y del sueño REM indica una reducción significativa en ambos grupos (figura 29).

Esta figura muestra los efectos de la administración intracerebroventricular de 700 ng de la gp120 derivada del VIF y del VIH. A las 13:00 horas hubo un incremento significativo del estado de vigilia, mientras que a las 21:00 hubo un decremento significativo (VIF- y VIH-gp120 vs salina y VIH-gp120 hervida). A las 01:00 horas, un decremento significativo fue mantenido por el grupo VIH-gp120. Con respecto al SOL1, el grupo VIH-gp120 presentó un incremento en todo el periodo de registro, mientras que el grupo VIF-gp120 presentó un importante incremento a las 13:00, 21:00 y 01:00 horas. El SOL2 tuvo un importante decremento en ambos grupos tratados con la gp120 (13:00, 17:00, 05:00 y 09:00 horas) mientras que el grupo VIH-gp120 tuvo también un incremento significativo a las 01:00 horas. El sueño REM decreció en ambos grupos a las 13:00. Las diferencias son ** $p < 0.05$, donde VIF-gp120 y VIH-gp120 difieren significativamente de los grupos salina y VIH-gp120 hervida, $x p < 0.05$ donde VIF-gp120 difiere de salina y VIH-gp120 hervida y finalmente * $p < 0.05$ donde VIH-gp120 difiere con los grupos salina y VIH-gp120 hervida.



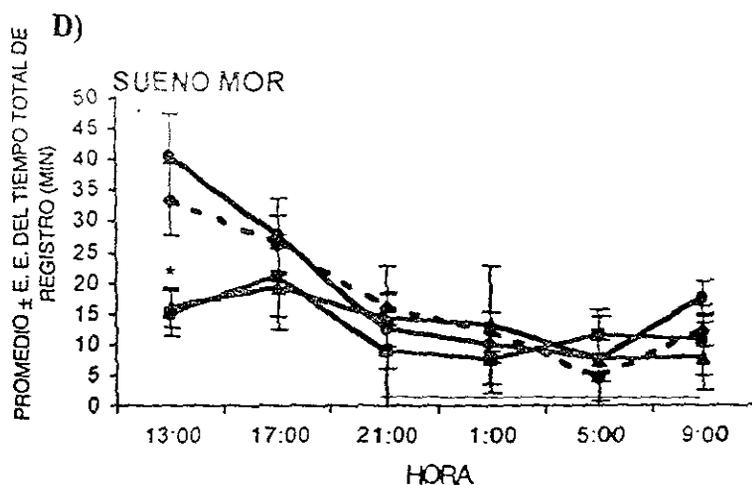
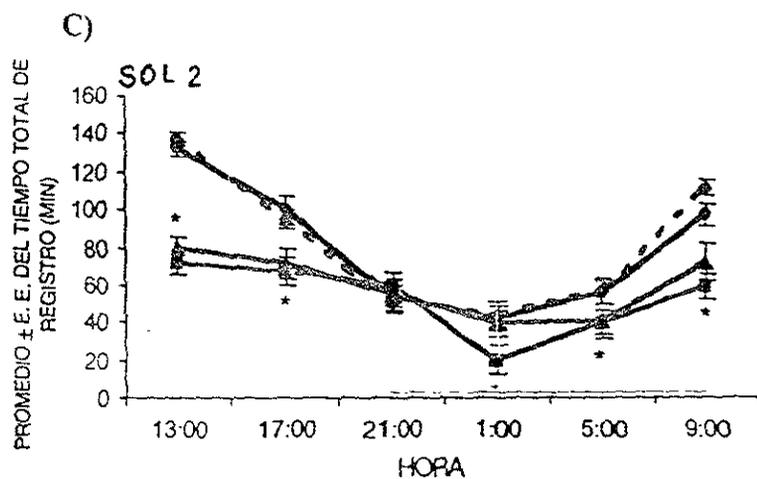


FIGURA 29: Esta figura muestra los efectos de la gp120 de ambos virus en el ciclo sueño-vigilia. A las 13:00 hr hubo un importante incremento en la vigilia y a las 21:00 hr hubo un decremento significativo (VIF- y VIH-gp120 vs controles). Asimismo, a las 01:00 el decremento fue mantenido solo por el grupo tratado con VIF-gp120. Con respecto al SOL1, el grupo tratado con VIH-gp120 presentó un importante incremento a lo largo de las 24 h de registro mientras que el grupo tratado con VIF-gp120 presentó un incremento significativo a las 13:00, 21:00 y a las 01:00 horas. El SOL2 tuvo un importante decremento en ambos grupos tratados con VIF- y VIH-gp120 a las 13:00, 17:00, 5:00 y 9:00 hr. mientras que VIH-gp120 solo tuvo un incremento significativo a las 01:00. EL sueño MOR disminuyó significativamente en los grupos tratados con VIF y VIH-gp120 solo a las 13:00

A continuación presentamos el análisis estadístico en cada estado de alerta:

a) VIGILIA

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	22
Total	25

Análisis de Varianza (valor de F)			
Hora	13:00	21:00	01:00
Entre grupos	41.36622	5.15345	6.02616
Dentro de los grupos	p = .0001	p = .0075	p = .0037

Prueba F de Scheffe para vigilia

hora	13:00	21:00	01:00
NaCl	VIF (18.07) VIH (21.93)	VIF (3.84) VIH (3.78)	VIF (5.49)
VIH-gp120 hervida	VIF (19.25) VIH (23.23)	VIF (3.81) VIH (3.69)	
VIF-gp120			
VIH-gp120			

b) SUEÑO DE ONDAS LENTAS 1

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	22
Total	25

Análisis de Varianza (valor de F)						
	13:00	17:00	21:00	01:00	05:00	09:00
Entre grupos	31.19725	10.10401	23.97143	104.00029	16.9951	32.21305
Dentro de los grupos	p = .0001	p = .0002	p = .0001	p = .0001	p = .0001	p = .0001

Prueba F de Scheffe para SOL1

tiempo	13:00	17:00	21:00	01:00	05:00	09:00
NaCl	VIF (14.53) VIH (19.55)	VIH (8.38)	VIF (13.47) VIH (16.82)	VIF (47.15) VIH (63.43)	VIH (12.09)	VIH (21.59)
VIH-gp120 hervida	VIF (11.59) VIH (16.12)		VIF (7.02) VIH (9.5)	VIF (40.31) VIH (55.45)	VIH (10.4)	
VIF-gp120						
VIH-gp120						

c) SUEÑO DE ONDAS LENTAS 2

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	22
Total	25

Análisis de Varianza (valor de F)					
hora	13:00	17:00	01:00	05:00	09:00
Entre grupos	37.17661	40.46529	33.86442	97.27886	35.06441
Dentro de los grupos	p = .0001				

Prueba F de Scheffe para SOL 2

hora	13:00	17:00	21:00	01:00	05:00	09:00
NaCl	VIF (15.23) VIH (19.78)	VIF (20.34) VIH (23.87)		VIH (22.33)	VIF (48.41) VIH (50.35)	VIF (7.23) VIH (15.01)
VIH-gp120 herbida	VIF (17.07) VIH (21.87)	VIF (16.58) VIH (19.78)		VIH (24.90)	VIF (42.21) VIH (48.26)	VIF (16.72) VIH (27.83)
VIF-gp120						
VIH-gp120						

d) SUEÑO MOR

Análisis de Varianza		
Fuente	grados de libertad	F-test
Entre grupos	3	34.21332
Dentro de los grupos	22	p = .0001
Total	25	

Prueba F de Scheffe para SUEÑO MOR

tiempo	13:00
NaCl	VIF (20.37) VIH (22.98)
VIH-gp120 herbida	VIF (10.88) VIH (12.82)
VIF-gp120	
VIH-gp120	

TABLA 15: En esta tabla muestra el análisis estadístico de los estados del ciclo sueño-vigilia. Se presentan los datos para a) vigilia, b) sueño de ondas lentas 1, c) sueño de ondas lentas 2 y d) sueño MOR. En cada caso se presenta el valor de F tanto entre grupos como dentro de los grupos. Solo en aquellos casos donde p fue menor de 0.05 se realizó la prueba pos hoc de Scheffe misma que indica en que pares de grupos existen diferencias significativas. Estas diferencias se mostraron en la figura 29.

3.5 LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA ESPONTANEA Y LA EJECUCION EN LA VIGA DE DRUCKER ESTAN DETERIORADAS EN LOS GRUPOS TRATADOS CON LA gp120 DERIVADA DEL VIF Y DEL VIH.

Como se podrá observar en la siguiente figura, la gp120 del VIH y del VIF deterioran la actividad locomotora espontánea.

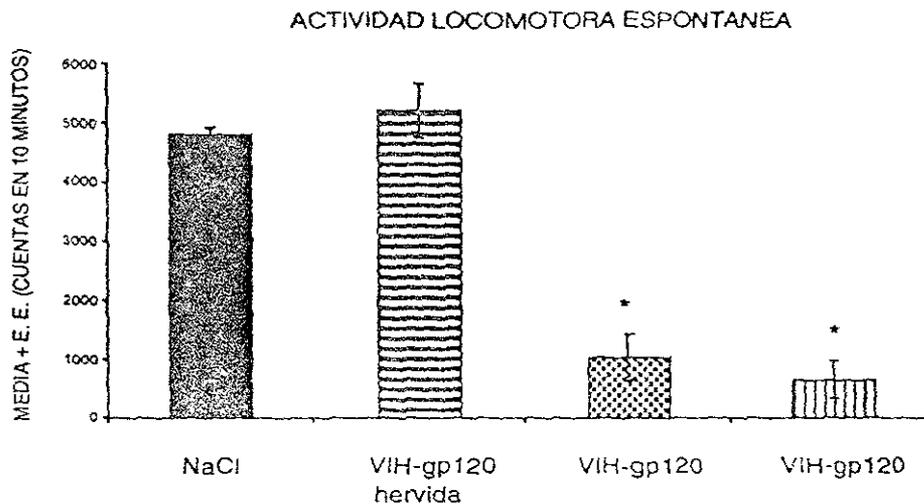


FIGURA 30: En esta figura observamos que la actividad locomotora espontánea está deteriorada en los grupos que fueron tratados con ambas gp120. Las diferencias son: * $p < 0.01$, VIH- y VIF-gp120 vs controles (NaCl, VIH-gp120 hervida). Este deterioro esta ausente en el grupo control que fue tratado con la VIH-gp120 hervida.

Análisis de Varianza de la actividad motora		
Fuente	grados de libertad	F-test:
Entre grupos	3	112.87468
Dentro de los grupos	22	$p = .0001$
Total	25	

Prueba F de Scheffe

	NaCl	VIH-gp120 hervida	VIF-gp120	VIH-gp120
NaCl				
VIH-gp120 hervida				
VIF-gp120	55.63	66.91		
VIH-gp120	45.95	56.26		

Tabla 16: En esta tabla mostramos el análisis de varianza de la concentración de AMPc. El valor de p indica diferencias significativas, por lo que al análisis pos hoc con la prueba de Scheffe encontramos que * $p < 0.01$, donde NaCl y ETOH son diferentes a los grupos tratados con Forscolina, VIH-gp120, VIH-gp120 + Fk y VIH-gp120 hervida + Fk; ++ $p < 0.01$, donde Foscolina es diferente a los grupos tratados con VIH-gp120, VIH-gp120 + Fk y VIH-gp120 hervida; = $p < 0.01$, donde VIH-gp120 es diferente a VIH-gp120 + Fk, VIH-gp120 hervida y VIH-gp120 hervida + Fk; o $p < 0.01$, donde VIH-gp120 hervida es diferente a VIH-gp120 + Fk

En la prueba de equilibrio de Drucker. se observó el efecto de ambas glicoproteínas en animales que aprendieron la ejecución de la tarea (linea base), y que recibieron el tratamiento por inyección ICV. 24 horas después de esta inyección se realiza la evaluación de la actividad de equilibrio y locomotora.

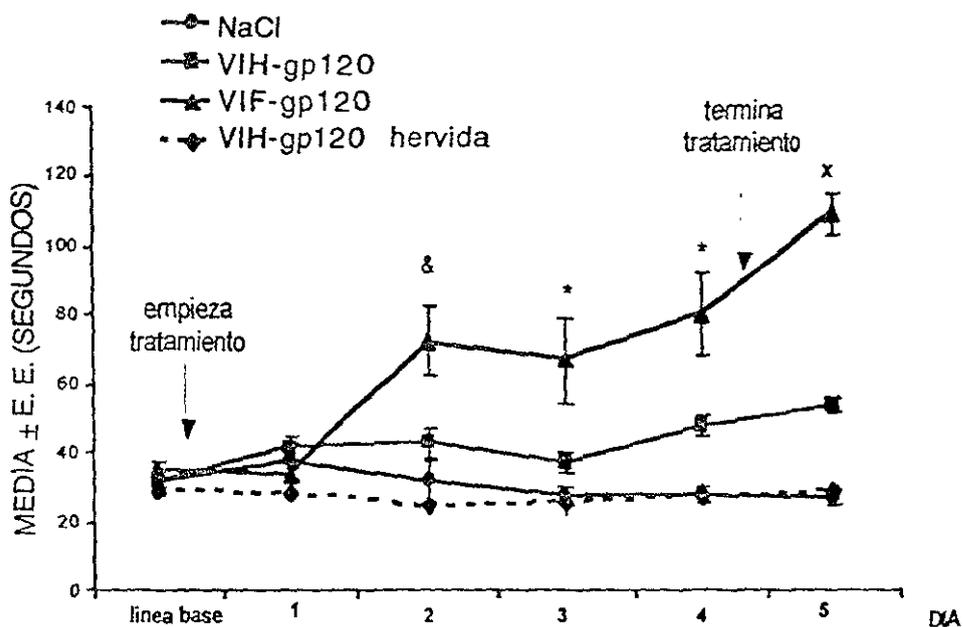


FIGURA 31: Como se podrá observar en ésta gráfica, la ejecución de los animales tratados con la gp120 se empieza a deteriorar de acuerdo al tratamiento recibido. En el segundo día después de empezar el tratamiento, el grupo tratado con VIF-gp120 empieza a tardar mas en llegar a su caja (& $p < 0.05$ VIF-gp120 vs VIH-gp120, VIH-gp120 hervida, NaCl). Este deterioro continúa en el día 3, pero desaparece las

diferencias con el grupo tratado con VIH-gp120 (* $p < 0.05$, VIH- and VIF-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida). En el 5 día de evaluación, ambos grupos tratados con la gp120 son diferentes entre ellos, pero también a los controles ($x p < 0.05$, VIF-gp120 vs VIH-gp120; $x p < 0.05$, VIF-gp120 y VIH-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida).

Análisis de Varianza	
Fuente	grados de libertad
Entre grupos	3
Dentro de los grupos	21
Total	24

Análisis de Varianza en la prueba de Drucker (valor de F)						
Fuente	Línea basal	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día	Quinto día
Entre grupos	1.74511	.06204	4.90607	3.45755	5.70734	67.39449
Dentro de los grupos	$p = .1885$	$p = .9792$	$p = .0097$	$p = .0348$	$p = .0051$	$p = .0001$

Prueba F de Scheffe

tiempo	basal	ter día	2do día	3er día	4to día	5to día
NaCl			VIF-gp120 (6.79578)	VIF (7.4628) VIH (3.9427)	VIF (5.224.3) VIH (4.1542)	VIF (55.2937) VIH (4.98)
VIH-gp120 hervida			VIF-gp120 (8.12)	VIF (7.9567) VIH (4.0124)	VIF (6.352) VIH (5.5375)	VIF (23.8475) VIH (5.364)
VIF-gp120						VIH (25.5876)
VIH-gp120			VIF-gp120 (5.2875)			

Tabla 17: En esta gráfica presentamos el análisis estadístico de la ejecución en la prueba de Drucker. Como se podrá observar, la ejecución de la prueba se empieza a deteriorar en los animales tratados con la gp120. Las diferencias significativas aparecen al segundo día, donde el grupo tratado con VIF-gp120 empieza a tardar mas en llegar a su caja. La prueba pos hoc indica diferencias entre el grupo tratado con VIF-gp120 vs VIH-gp120, VIH-gp120 hervida, NaCl, an tanto, este deterioro continúa en el día 3 y 4, pero desaparece las diferencias con el grupo tratado con VIH-gp120 (* $p < 0.05$, VIH- and VIF-gp120 vs VIH-gp120 hervida y NaCl). En el 5 día de evaluación, ambos grupos tratados con la gp120 son diferentes entre ellos, pero también a los controles ($x p < 0.05$, VIF-gp120 vs VIH-gp120; $x p < 0.05$, VIF-gp120 y VIH-gp120 vs NaCl y VIH-gp120 hervida).

3.6 HISTOLOGIAS

A continuación presentamos las figuras que representan la localización de las cánulas en la mayoría de los casos, así como localización de los electrodos de registro y estimulación en el hipocampo.

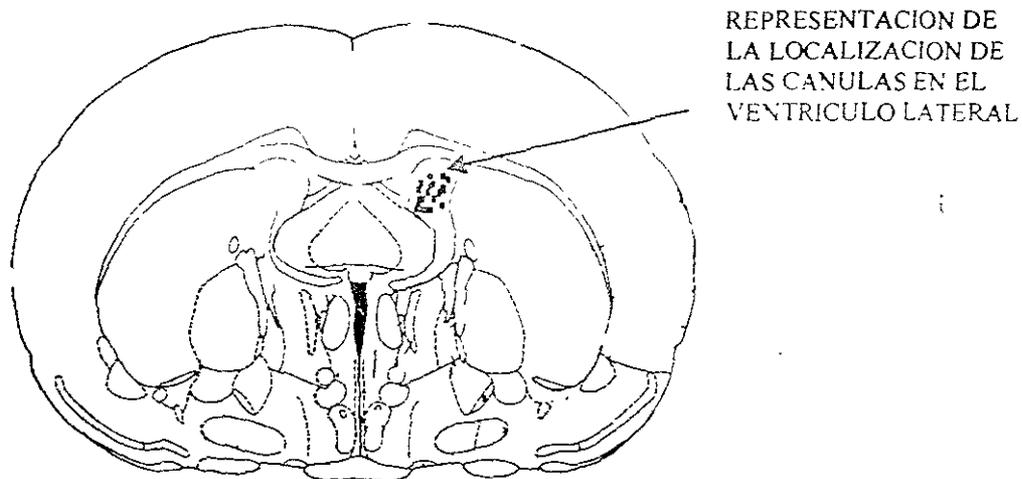
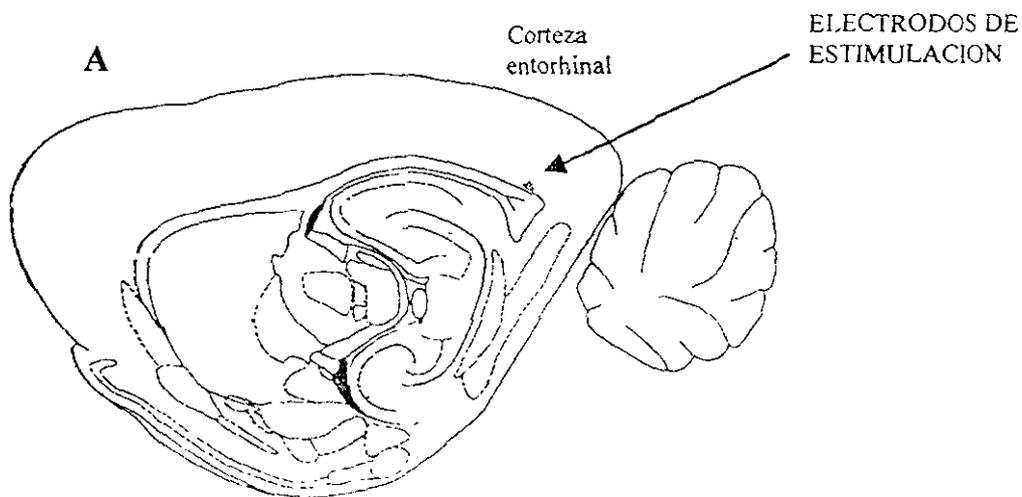


FIGURA 32: Representación del sitio donde se encontraron las puntas de las cánulas en las ratas implantadas en el ventrículo lateral.



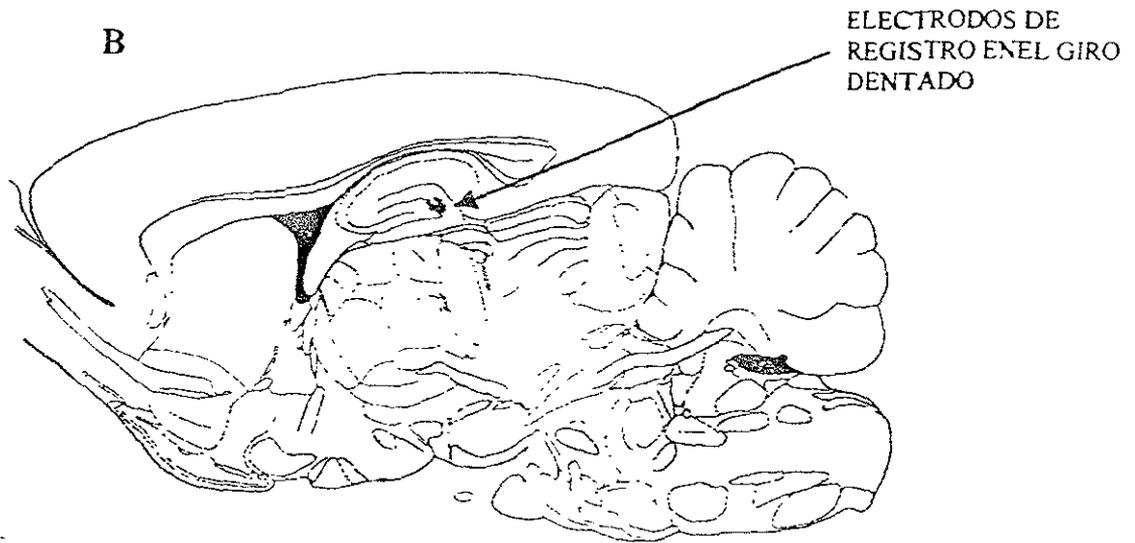


FIGURA 33: En esta figura se muestra el sitio de los electrodos de estimulación (A) en la corteza entorinal (vía perforante) y el de registro (B) en el giro dentado respectivamente.

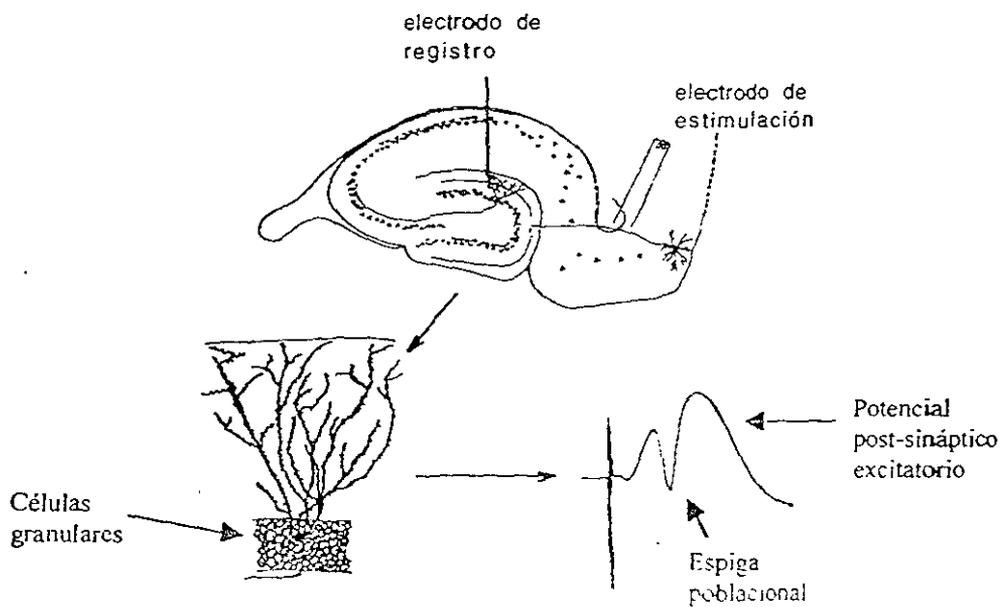


FIGURA 34: Representación del hipocampo, donde se señala el electrodo de estimulación (corteza entorinal vía perforante) y el electrodo de registro (giro dentado). Se registraron las células granulares y se busco la espiga poblacional misma que esta inmersa en el potencial postsináptico excitatorio.

3.7 DISCUSION

El presente estudio apoya la hipótesis de que la gp120 produce un deterioro en la función del sistema nervioso que va desde el aspecto conductual, el electrofisiológico, hasta el bioquímico.

a) Aspecto conductual

Estudios en cultivos neuronales indican que la gp120 es neurotóxica, y se sugiere que la muerte neuronal ocurre por el flujo masivo de Ca^{2+} hacia el espacio intracelular a través de los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} y/o receptores NMDA activados por glutamato (Lannuzel y cols., 1995; Lipton, 1998).

Por otra parte, Toggas y cols., (1994) han demostrado que los ratones transgénicos que expresan gp120 a nivel cerebral presentan características similares a los daños neuronales observados en humanos infectados con el VIH, tal como palidez de la sustancia blanca y atrofia cortical. En su estudio demuestran que la severidad del daño neuronal se relaciona proporcionalmente con los niveles de expresión de RNA mensajero para la gp120, siendo los niveles mas altos en neocorteza, bulbo olfatorio e hipocampo (Toggas y cols, 1994).

Tomando en cuenta estos antecedentes, podríamos establecer que el daño en estructuras involucradas en tareas de aprendizaje espacial (Glowa y cols., 1992) o contextual (Pugh y cols., 2000) como el hipocampo podrían explicar la deficiencia observada en la ejecución en el laberinto circular de Barnes.

Para discutir esta posibilidad, varios estudios indican que la lesión hipocampal, o bien, la administración de antagonistas específicos para el receptor NMDA, produce un patrón de retardo en la adquisición de la memoria espacial cuando se utiliza el laberinto acuático de Morris (Morris y cols., 1982; 1986; Steele, 1999), misma que requiere que los animales desarrollen una estrategia espacial para localizar la plataforma escondida por debajo del agua.

Con base en esto, Glowa y cols., (1992), demostraron que existe un deterioro en la adquisición de la tarea espacial en el laberinto acuático de Morris después de la administración ICV de la gp120 derivada del VIH, lo que hace suponer que esta glicoproteína podría estar contribuyendo al daño neuronal.

Debido a que el laberinto acuático de Morris y el laberinto circular de Barnes comparten el mismo fundamento en la evaluación de la función hipocampal (McLay y cols, 1999), y debido a que el laberinto circular de Barnes ofrece ciertas ventajas en la adquisición de la tarea y el desarrollo de estrategias durante el transcurso del aprendizaje (Bach y cols., 1995), nuestro interés fue comprobar que la administración de la gp120 por vía ICV producía una deficiencia en la adquisición de la memoria espacial. El fundamento que apoya esta idea es de que a medida de que los animales se exponen a la misma situación de aprendizaje (localizar el tunel de escape), van desarrollando estrategias que les ayuda a mejorar la búsqueda y reducir el tiempo en localizar el agujero. Para esto, los animales regularmente pasan de una exploración aleatoria al desarrollo de una estrategia serial, y finalmente al desarrollo de una estrategia espacial. Por tanto esta tarea, necesita de la participación del hipocampo (Bach y cols, 1995, McLay y cols, 1999).

Es importante establecer que la conducta del animal de explorar en forma indistinta los diferentes agujeros sin seguir un patrón definido o estrategia, coincide con los estadios tempranos del aprendizaje en la laberinto circular de Barnes. A medida de que las sesiones de aprendizaje aumentan (a medida de que el animal se expone a mas situaciones de aprendizaje), aumenta la posibilidad de que el animal desarrolle una estrategia mas útil para encontrar el túnel de escape en menos tiempo, y en este caso, la estrategia serial se desarrolla primero y después la estrategia espacial. La estrategia serial consiste primero en llegar en forma indistinta a un agujero, y a partir de éste, ir explorando uno por uno hasta encontrar el agujero de escape y como consecuencia se

reduce el tiempo para escapar. Cuando el animal ha identificado la localización del agujero con respecto a señales de orientación como por ejemplo la posición de los objetos dentro del cuarto, se va adquiriendo un mapa espacial que los lleva a escapar en menor tiempo. Esto se apoya por la teoría de la navegación propuesta por Muller (1991) que propone que la ejecución espacial requiere de dos componentes: un mapa espacial que es la habilidad de representar topográficamente el medio ambiente con base a las figuras, formas y la distribución de los estímulos en ese mismo medio; y la capacidad de navegación, que es la capacidad de formular el camino mas corto y la forma mas eficiente a través de relacionar todos los estímulos en todo ese ambiente. La estrategia espacial es una forma mucho mas rápida y directa para encontrar el túnel de escape, y por lo tanto es una forma de evaluar la memoria, ya que la interferencia de la actividad funcional del hipocampo produce deterioro conductual en esta tarea (Barnes, 1979; Barnes y cols., 1989; Bach y cols, 1995; McLay 1999).

Los resultados obtenidos demuestran efectivamente que las ratas tratadas con la gp120 derivada del VIF o del VIH tardan mas tiempo en aprender a localizar el agujero de escape, y en la mayor parte de las sesiones usan una forma aleatoria de exploración y en pocos casos desarrollan una estrategia serial. A pesar de que el tiempo para encontrar el túnel de escape está disminuido en los últimos ensayos, la forma de encontrar el túnel de escape demuestra que estos animales carecen de la habilidad de desarrollar una estrategia espacial, y por consiguiente apoya la idea de una disfunción hipocampal. Además, es importante establecer que la disminución en el tiempo para encontrar el túnel y la desaparición de las diferencias significativas a partir de la sesión 10 en el grupo tratado con VIF-gp120 o en la sesión 15 con el grupo tratado con la VIH-gp120 permite apoyar la idea de que la ejecución motora no interfiere con la ejecución de la tarea, por lo que permite descartar que el problema motor sea la causa del deterioro en el aprendizaje.

Además, los estudios piloto en este trabajo, demuestran también que la actividad motora de escape en la prueba de prevención pasiva no está deteriorada en los grupos tratados con gp120 de ambos virus (VIF y VIH).

b) del aspecto conductual al aspecto electrofisiológico

Por otra parte, Shapiro y cols., (1999), han establecido que los mecanismos de plasticidad sináptica son independientes a los mecanismos de ejecución. Estos autores han demostrado que cuando un animal ha aprendido la ejecución de una tarea espacial en un ambiente en particular, el uso de antagonistas para los receptores NMDA interfiere con la adquisición de un nuevo aprendizaje espacial, es decir, cuando el animal es expuesto a un ambiente diferente al que ha aprendido previamente y es tratado con antagonistas de los receptores NMDA, este animal muestra un deterioro para aprender bajo las nuevas condiciones aunque la forma en ejecutar la tarea no se encuentra deteriorada..

Mientras los grupos controles reducen la tasa de errores con respecto al número de entrenamientos, la distancia explorada también disminuye, mientras que los grupos tratados con gp120 siguen explorando distancias lejanas al agujero de escape. Esto sugiere que la capacidad para usar las diferentes señales para orientarse al agujero de escape está deteriorada y puede apoyar la idea de que la memoria de referencia está afectada. Diversos estudios indican que este componente de referencia es muy importante para el desarrollo de la memoria espacial (Morris y cols., 1982; 1986; Steele, 1999), ya que la adquisición de puntos claves en el espacio ayuda a identificar el túnel de escape.

Debido a que se ha propuesto que la función hipocámpal es necesaria para el aprendizaje espacial, se sugiere que la plasticidad en esta estructura juega un papel importante para el mantenimiento de la memoria. Por tanto, se propone que las sinapsis entre dos neuronas que

están conectadas y que participan en un evento en particular, tienen la habilidad de cambiar a través de la formación de nuevas sinapsis inducidas por un nuevo evento, y por tanto, almacenar ese nuevo cambio en una nueva representación neuronal. Esta hipótesis propuesta por Hebb en 1949 tuvo sus primeras evidencias con los trabajos de Bliss y Lomo en 1973 quienes descubrieron que la eficiencia de respuesta poblacional a una estimulación eléctrica mínima se ve potenciada después de una estimulación de alta frecuencia breve, lo que condujo a la descripción de la potenciación de largo plazo en el hipocampo de conejo.

El descubrimiento de la LTP en una estructura que estaba relacionada con eventos de memoria permitió establecer que el hipocampo puede ser un sustrato biológico de la hipótesis propuesta por Hebb. Por tanto, la LTP es un modelo electrofisiológico para explicar una forma de memoria basado en la plasticidad neuronal del hipocampo (Bliss y Collingridge, 1993; Lynch, 1998).

Manipulaciones farmacológicas demostraron que la inducción de LTP puede bloquearse con el uso de antagonistas a los receptores de NMDA. A diferencia de la inducción, la expresión de LTP y la transmisión sináptica basal, no se ven afectadas por los mismos antagonistas, y esto se debe a que estos últimos están controlados por receptores no-NMDA (o receptores AMPA) (Bliss y Collingridge, 1983 y 1993).

Morris y cols., en 1986, fueron los primeros en reconocer que el deterioro del aprendizaje espacial observado en lesiones de hipocampo también se observa cuando se aplica APV (ácido aminofosfonovalerico), un antagonista de los receptores NMDA.

Posteriormente, se estableció que la potenciación de largo plazo inducida en el giro dentado al igual que en CA1 dependen de la activación de los receptores NMDA (Bliss y Collingridge, 1993). Este hallazgo ha sido confirmado con el uso de otros antagonistas de los receptores NMDA como el MK-801 y el NPC-17742, mismos que deterioran el aprendizaje

espacial y bloquean completamente la inducción de LTP tanto en el giro dentado como en el CA1 en ratas (Hargreaves y cols., 1997). De acuerdo a lo anterior, podemos sugerir que la actividad funcional del hipocampo en los animales tratados con gp120 esta deteriorada.

Krucker y cols. (1998) han reportado que los ratones transgénicos (tg) que expresan gp120 del VIH tienen un incremento en la amplitud de los potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSP), combinado con un incremento significativo en la facilitación por pulsos pareados. Estos resultados sugieren que hay un incremento en la excitabilidad en estos ratones tg, lo que es apoyado por los resultados en la curva corriente voltaje que obtuvieron. En nuestro experimento, no hubo cambios en la curva corriente-voltaje ni en el protocolo de pulsos pareados, lo que permite inferir que la excitabilidad y los circuitos intrínsecos responsables de la inhibición-potenciación-inhibición no han sido modificados por el tratamiento con la gp120.

Mientras Krucker demuestra que la potenciación postetánica (PPT) está considerablemente aumentada en las rebanadas de hipocampo, en nuestro estudio mostramos que la PPT esta importantemente disminuida en los grupos tratados con ambas gp120, tanto de VIF como de VIH. Mientras el grupo control mostró una espiga poblacional robusta de 240%, el grupo tratado con VIF-gp120 tuvo un incremento del 120%, el grupo VIH-gp120 cerca del 90%. Además es importante notar que el deterioro observado en el grupo control tratado con VIH-gp120 hervida fue diferente al grupo tratado con VIH-gp120, mismo que tuvo un incremento cercano al 160%. Esto indica que a diferencia del estudio hecho por Krucker y cols., la potenciación postetánica estuvo deteriorada en los grupos que recibieron VIH-gp120 y VIF-gp120.

Los ratones transgénicos muestran una disminución en la LTP y en contraste, nuestro estudio muestra un deterioro significativo de la LTP solo en el grupo tratado con gp120 derivado del VIH. Esto hace suponer que el decremento de la LTP en las ratas que recibieron VIH-gp120

puede ser debido a una deficiencia en los mecanismos involucrados en la inducción del mismo tales como el sistema intracelular de segundos mensajeros (Schuz y cols., 1999; Davis y cols., 2000).

c) Del aspecto electrofisiológico al aspecto bioquímico

Debido a que existe una estrecha relación acerca de los mecanismos electrofisiológicos en la inducción y mantenimiento de LTP tanto en el giro dentado como en CA1 (Bliss y Collingridge, 1993), el siguiente paso fue determinar los mecanismos moleculares que participan en ambos. Trabajos *in vitro* hechos por Chetkovich y Sweatt en 1993, demuestran que diferentes manipulaciones en rebanadas de hipocampo tales como la aplicación de NMDA, la estimulación de alta frecuencia en las colaterales de Schaffer, o el incremento de K⁺ extracelular se acompañan de un aumento en la concentración de AMP cíclico así como la formación de LTP. En este trabajo, señalan que este aumento de AMPc como el LTP son revertidos con el uso de antagonistas (N-(6-aminoexyl)-5-cloro-1-naftalenesulfonamida (W-7) y trifluoperazina (TFP) para la calmodulina. Esto sugiere que la estimulación tetánica estaría asociada a una activación de los receptores NMDA, con el consiguiente aumento de calcio intracelular seguido del acoplamiento con la calmodulina. El complejo calcio/calmodulina, actuaría en sitios específicos de la adenilciclase para la formación de AMPc. Trabajos realizados por Wu y cols., (1995) así como Wong y cols., (1999) donde producen animales transgénicos que no expresan la adenilciclase 1 y la adenilciclase 8 (AC1 y AC8), confirman que la adenilciclase juega un papel importante en la formación de AMPc para la inducción y mantenimiento de la LTP, ya que en estos animales este fenómeno no se presenta. Posteriormente Otmakhova y cols., (2000) usando el inhibidor de la adenilciclase, el SQ 22536, confirma la importancia de esta cascada. Esto sustenta el hecho de que la formación de AMPc participa en la formación de LTP

postsinápticamente (Blitzer y cols., 1995; Schulz y cols., 1999), y que la producción de la proteína cinasa A (PKA) es el siguiente paso crítico de esta cascada molecular (Nguyen y Kandel, 1996), ya que sus inhibidores como el KT5720 (Huang y Kandel, 1994), H89, PKI (Otmakhova y cols, 2000) han mostrado bloqueo selectivo de la LTP.

Recientemente Westhal y cols, (1999) han demostrado que la PKA actuaría activando a los receptores NMDA a través de una proteína llamada *yotiao*, aumentando la conductancia en estos receptores, permitiendo mas flujo de Ca^{++} , contribuyendo al mantenimiento de la respuesta potenciada.

Estos resultados funcionales apoyan los estudios hechos por Xia y cols, 1991, donde demostraron la distribución del RNAm que codifica para la adenilciclase que es sensible al complejo calcio/calmodulina, y entre ellas se encuentra la neocorteza, hipocampo (células granulares y piramidales) y bulbo olfatorio. Recientemente se han identificado nueve tipos de adenilciclase, pero, solo la AC1, la AC3 y la AC8 son sensibles a Ca^{++} y calmodulina. La AC1 se ha detectado además en corteza entorinal, corteza olfatoria, cerebelo y glándula pineal (Xia y Storm, 1997).

Davis y cols., 2000, hacen un estudio detallado en el giro dentado acerca de los pasos moleculares posteriores a la formación del complejo calcio/calmodulina, producción de PKA y PKC. Estos autores establecen que estas tres enzimas coinciden y actúan en la cascada de la MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular-regulated kinase (MAPK/ ERK) cascade), misma que activaría por un lado al CREB (cAMP response element-binding protein) a través de Rsk2 (CREB kinase ribosomal protein S6 kinase) y por otro lado activaría en forma directa a Elk-1 (que es un complejo MAPKsc-Jun N-terminal protein kinase (JNK), p38, and ERK).

Por un lado CREB activaría al sitio CRE localizado en las regiones promotoras de los genes inmediatos tempranos (IEGs), en tanto que Elk-1 es un regulador transcripcional de la expresión de genes y actuaría a través del SRE (serum response element) para la regulación en la inducción de IEGs. Esto sería responsable de la producción de proteínas y mantenimiento de la LTP (Davis y cols., 2000).

Se ha demostrado que en la inducción de la LTP existen dos fases donde hay aumento de CREB. La primera ocurre a los 5 minutos con un pico máximo a los 30 minutos y la segunda ocurre a partir de las 2 hr manteniéndose al menos hasta 24 horas. Se piensa que la primer fase se debe a la activación de CREB por la CAMKII y la segunda por la PKA (Schultz y cols., 1999).

d) Potencial efecto de la gp120

Por tanto, en nuestros experimentos, la gp120, estaría interfiriendo postsinápticamente en dos niveles. Primero, la potenciación postetánica deficiente observada en los dos grupos tratados tanto con el VIH-gp120 como con el VIF-gp120, hace suponer que hay una deficiencia en la activación de los receptores NMDA. Aunque se demostró que tanto la excitabilidad del sistema (protocolo de corriente-voltage) estaba conservada, así como los mecanismos de regulación de la excitabilidad (protocolo de pulsos pareados), la inducción de la PTP demostró que el sistema de inducción (receptores NMDA) en los grupos tratados con gp120 estaba deteriorada.

Esto hace pensar que probablemente exista una regulación negativa de los receptores por estimulación continua de los mismos por la gp120 durante el tratamiento por cinco días. Esto está apoyado por los trabajos de Pattarini y cols. (1998) donde describen que el sitio para la glicina en el receptor NMDA es el responsable de la entrada masiva de Ca^{++} , y la consecuente neurotoxicidad por niveles altos de Ca^{++} cuando se administra gp120. Pensando en esta posibilidad, tal vez la estimulación continua de los receptores NMDA en los sitios de glicina por

la gp120 durante el tratamiento por cinco días contribuye a un aumento de calcio intracelular con el consiguiente efecto en la regulación negativa de los receptores a nivel postsinápticos. Trabajos hechos por Cebers y cols., (1999) indican que el aumento continuo de glutamato por inhibición de su recaptura (manteniendo los niveles por debajo de la dosis neurotóxica), o bien, el uso de agonistas de glutamato, tiene un efecto en la función del receptor NMDA.

Por una parte, se ha comprobado que existe una disminución en la función de los receptores NMDA después de una estimulación prolongada, ya que los niveles de RNAm de las subunidades NR1 y NR2A está disminuido (Rensik y cols, 1995), y por otra parte existe la posibilidad de que exista una disminución en su densidad poblacional (Rensik y cols., 1996). Esta regulación negativa de los receptores NMDA por gp120, pero no de los receptores AMPA o de las interneuronas GABAérgicas, pudiera ser la explicación a la ausencia de cambios en la excitabilidad o de alteración de los circuitos que controlan la inhibición-potenciación-inhibición. Por tanto la falta de activación de los receptores NMDA podría explicar la activación de la cascada molecular de segundo mensajero a través de la inducción de AMPc.

La segunda forma en que la gp120 pueda interferir con el deterioro de los segundos mensajeros es a través de los receptores a quimiocinas CXCR4 y CCR5 (Catani y cols., 2000), y a través de estos, inducir la activación de proteína G inhibitoria (Gi) (Zheng y cols., 1999 y 1999b; Klein y cols., 1999). Estos autores han mostrado además que la gp120 y diferentes viriones del VIH (producidos en linfocitos T) inhiben la producción de AMPc, e incrementan el 1,4,5-trifosfato, aumentan el calcio intracelular y producen apoptosis en neuronas.

Meucci y cols. (1998) describieron la existencia de receptores a quimiocinas en neuronas hipocámpales. Estos receptores son: CCR1, CCR4, CCR5, CCR9/10, CXCR2, CXCR4, CX3CR1 y receptor a la fractalina. Experimentos de imagenología con Fura-2 indican la

existencia de dos tipos neuronales. El primero de ellos muestra imágenes donde las concentraciones de calcio son estables y cuando se les agrega estas quimiocinas o la gp120 existe un incremento de calcio intracelular. El segundo grupo neuronal presenta oscilaciones en la concentración de Ca, y prácticamente no hay efecto ante la administración de citocinas. Por otro lado, esas oscilaciones desaparecen cuando se aplican antagonistas a NMDA. Cabe aclarar que los efectos de la citocinas fueron directos, ya que los experimentos fueron hechos en cultivos neuronales ausentes de células gliales.

Por todo lo anterior podemos suponer que los efectos tanto en el deterioro de la memoria espacial y como de la producción de LTP y AMPc en los grupos tratados con el VIH-gp120, se está interfiriendo con la cascada molecular de eventos que estarían participando en esta cascada molecular para la activación de PKA y la producción de proteínas que participen en la plasticidad neuronal.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el estudio de ciclo sueño-vigilia, indican que el estado de vigilia está alterada, ya que los animales tratados con ambas glicoproteínas muestran un aumento en el tiempo que están despiertos durante el periodo de luz, cuando normalmente las ratas controles están dormidas y en caso contrario, muestran una disminución del estado de vigilia en el periodo de oscuridad, cuando las ratas controles tienen el máximo nivel de vigilia. Asimismo, el grupo HIV-gp120 presentó un incremento significativo del SOL1 durante todas las 24 horas de registro, en tanto que el grupo VIF-gp120 mostró un incremento solamente a las 13:00, 21:00 y 01:00 horas. A su vez, la evaluación del SOL2 y del sueño MOR indica una reducción significativa en ambos grupos. El cambio en la distribución de la vigilia y el aumento del SOL1 apoya las observaciones en pacientes portadores del VIH (Wiegand y cols., 1991; Kubicki y cols., 1988; Norman y cols., 1990; Darko y cols., 1992; 1995a y 1995b; White y cols.,

1995), ya que en estos, existe un aumento del estado 1 del sueño y un aumento en el número de transiciones a vigilia. En nuestros animales existió un incremento en la frecuencia de transiciones del SOL1 a vigilia, pero no fueron significativas. Por otra parte, el deterioro en el sueño MOR se relaciona con los mecanismos relacionados a la consolidación de la memoria y cuando se interfiere con este evento (por ejemplo la privación del sueño MOR), existe un déficit conductual en tareas de aprendizaje (Roehrs y Roth, 2000; Kunz y Herrmann, 2000). Otros estudios indican que la reducción del sueño MOR se acompaña también de un deterioro de la memoria (Skagaggs y cols., 1996) y podría contribuir a los cambios conductuales observados en las ratas tratadas con gp120.

Por tanto, podemos decir que son varios los factores que están alterados por la administración de la gp120 tanto de VIF como de VIH por tanto nuestras conclusiones serían las siguientes.

3.8 CONCLUSIONES

La gp120 puede tener un efecto directo en las neuronas, aunque los mecanismos potenciales serían a través de los receptores NMDA, por tanto:

- a) Esto ayuda a explicar la ausencia de los cambios de excitabilidad en los grupos tratados con VIF-gp120 y VIH-gp120, ya que los receptores NMDA no participan en la transmisión basal en el hipocampo, y en este caso, los receptores responsables de la transmisión basal son los receptores AMPA.
- b) La ausencia de cambios en los pulsos pareados nos indica que los circuitos neuronales en el giro dentado se encuentran funcionales, y en este caso podemos decir que no existe un déficit en la regulación GABAérgica involucrado en la curva inhibición-potenciación-inhibición.
- c) El déficit observado en la potenciación posttetánica refleja un deterioro en la función de los receptores NMDA y esto podría ser consecuencia del deterioro producido por la

administración intracerebroventricular tanto de VIF-gp120 como de VIH-gp120, y probablemente la regulación negativa de los receptores NMDA sea responsable de este efecto.

- d) El déficit funcional de los receptores NMDA podría ser responsable del déficit en la activación de los segundos mensajeros a través de la activación de la adenilciclasa, provocando como consecuencia una disminución en la producción de AMPc y por tanto el deterioro de la potenciación de largo plazo.
- e) El deterioro de la potenciación de largo plazo en el grupo tratado con VIH-gp120 puede explicar el deterioro en el aprendizaje espacial observado en el laberinto de Barnes.
- f) Aunque es importante señalar que la LTP no estuvo significativamente deteriorada en el grupo tratado con VIF-gp120, el efecto en la potenciación postetánica podría contribuir al deterioro observado en la memoria espacial, aunque cabe señalar que la curva de aprendizaje mejoro en este grupo mas rápido que el grupo tratado con VIH-gp120.
- g) La disminución en la producción de AMPc apoya la participación de eventos moleculares encargados de la plasticidad neuronal en la memoria y LTP.
- h) Además de todo lo anterior, la alteración de los estados de alerta (ciclo sueño/vigilia) puede contribuir al deterioro conductual y apoyan las alteraciones observadas en pacientes portadores del VIH en la fase latente tardía y de SIDA.
- i) Nuestros resultados indican también que la gp120 derivada tanto del VIH como del VIF causan cambios conductuales y electrofisiológicos similares a los observados en los paciente portadores del VIH, así como los que están en el periodo clínico de SIDA.
- j) Otro mecanismo potencial seria el efecto de la gp120 en los receptores a quimiocinas acoplados a las proteínas G inhibitorias. En este caso, la disminución resultante de AMPc, y

REFERENCIAS

1. Andersen P. A., Bliss T. V. P., and Skrede K. K. (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Brain Res.* 13: 222-238.
2. Atkinson J. H., Grant Y., Kennedy C. J., Richman D. D., Spector S. A., and McCutchan J. A. (1988) Prevalence of psychiatric disorders among men infected with human immunodeficiency virus. A controlled study. *Arch. Gen. Psychiatry*, 45: 859-864.
3. Bach M. E., Hawkins R. D., Osman M, Kandel E. R., and Mayford M. (1995) Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII Mutant mice with selective loss of hippocampal LTP in the range of θ frequency. *Cell*, 81: 905-915.
4. Bagetta G., Corasaniti M. T., Paoletti A. M., Berliocchi L., Nistico R., Giamariolo A. M., Malorni W. and Finazzi-Agro A. (1998) HIV-1 gp120-induced Apoptosis in the rat neocortex involves enhanced expression of cyclo-oxygenase type 2 (COX-2). *Biochem. Biophys. Res Commun* 244: 819-824.
5. Bagetta G., Corasaniti M. T., Malorni W., Rainaldi G., Berliocchi L., Finazzi-Agrò A., and Nistico G. (1996) The HIV-1 gp120 causes ultrastructural changes typical of apoptosis in rat cerebral cortex. *NeuroReport*, 7: 1722-1724.
6. Baltimore D. C. and Feinberg M. B. (1989) HIV revealed: toward a natural history of infection. *N. Engl. J. Med.* 132: 1673.
7. Barnes C. A. (1979) Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93:74-104.
8. Barnes C. A., Eppich C., and Rao G. (1989) Selective improvement of aged rat short-term spatial memory by 3,4-diaminopyridine. *Neurobiol. Aging.* 10: 337-341.
9. Belman A. L., Diamon G., Dickson D. (1988) Pediatric Acquired Immunodeficiency syndrome. Neurologic syndromes. *Am. J. Dis Child*, 142: 29-35.
10. Bencherif B., and Rottenberg D. A. (1988) Neuroimaging of the AIDS dementia complex. *AIDS*, 12: 233-244.
11. Benos D. J., McPherson S., Hahn B. H., Chaikin M. A., and Benvenistes E. N. (1994a) Cytokines and HIV envelope glycoprotein gp120 stimulate Na⁺/K⁺ exchange in astrocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 13811- 13816.
12. Benos D. J., Hahn B. H., Bubien K. J., Ghosh S. K., Mashburn N. A., Chaikin M. A., Shaw G. M., and Benvenistes E. N. (1994b) Envelope glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus type 1 alters ion transport in astrocytes: Implication for AIDS dementia complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 494-498.
13. Berman N. E., Marcario J. K., Yong C., Raghavan R., Raymond L. A., Joag S. V., Narayan O.,

- Cheney P. D. (1999) Microglial activation and neurological symptoms in the SIV model of NeuroAIDS: association of MHC-II and MMP-9 expression with behavioral deficits and evoked potential changes. *Neurobiol Dis.* 6:486-98.
14. Bliss T. V. P. and Lomo T. (1993). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232:331-374.
 15. Bliss T. V. P. and Collingridge G. L. (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation. *Nature*, 361: 31-39.
 16. Blitzer R. D., Wong T., Nouranifar R., Iyengar R., Landau E. M. (1995) Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron* 15:1403-14.
 17. Blocker M. E., Cohen M. S. (2000) Biologic approaches to the prevention of sexual transmission of human immunodeficiency virus. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 14:983-99.
 18. Bozzette S. A., Finkelstein D. M., Spector S. A., Frame P., Powderly W. G., He W., Phillips L. (1995) A randomized trial of three antipneumocystis agents in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 332:693-699
 19. Brenneman D. E., Westbrook G. L., Fitzgerald S. P., Ennist D.L., Elkins K.L., Ruff M.R., and Pert C. B. (1988) Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature*, 335: 639-642.
 20. Brouwers P., Decarli C., Heyes M. P., Moss H. A., Wolters P. L., Williams G. T., Civitello L. A., and Pizzo P. A. (1996) Neurobehavioral manifestations of symptomatic HIV-1 disease in children: Can nutritional factors play a role?. *J. Nutr.* 16: 2651S-2662S.
 21. Bunien J. K., Benveniste E. N., and Benos D. J. (1995) HIV-gp120 activates large-conductance apamin-sensitive potassium channels in rats astrocytes. *Am. J. Physiol.* 268: C1440-C1449.
 22. Burgard M., Izopet J., Dumon B., Tamalet C., Descamps D., Ruffault A., Vabret A., Bargues G., Mouroux M., Pellegrin I, Ivanoff S., Guisthau O., Calvez V., Seigneurin J. Ml, Rouzioux C. (2000) HIV RNA and HIV DNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells Are Consistent Markers for Estimating Viral Load in Patients Undergoing Long-Term Potent Treatment. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 16:1939-1947.
 23. Buzy J. M., Brenneman D. E., Siegal F. P., Ruff M. R., and Pert C. B. (1989) Cerebrospinal fluid from cognitively impaired patient with acquired immunodeficiency syndrome shows gp120-like neuronal killing in vitro. *Am. J. Med.* 87: 361-362.
 24. Buzy J. M., Brenneman D. E., Pert C. B., Martin A., Salazar A. and Ruff M. R. (1992) Potent gp120-like neurotoxic activity in the cerebrospinal fluid of HIV-infected individuals is blocked by peptide T. *Brain Res.* 598: 10-18.

25. Cain DD. P., Hargreaves E. L. Boon F., and Dennison Z. (1993) An examination of the relation between hippocampal long-term potentiation, kindling, afterdischarge, and place learning in the water maze. *Hippocampus*, 3: 153-163.
26. Catani M. V., Corasaniti M. T., Navarra M., Nistico G., Finazzi-Agro A., Melino G. (2000) gp120 induces cell death in human neuroblastoma cells through the CXCR4 and CCR5 chemokine receptors. *J. Neurochem.* 74:2373-9.
27. Cebers G., Cebere A., Wagner A., Liljequist S. (1999) Prolonged inhibition of glutamate reuptake down-regulates NMDA receptor functions in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72:2181-90.
28. Centers for Disease Control and Preventions (1987) Revision of the CDC Surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. Morbidity and Mortality Weekly Report, MMWR supplement on August 14.
29. Centers for Disease Control and Preventions (1993) Update: Acquired Immunodeficiency Syndrome —United States, Vol. 42, No. 28
30. Centers for Disease Control and Preventions (1999) Guidelines for national human immunodeficiency virus case surveillance, including monitoring for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. MMWR. 48(RR13):1-31.
31. Chaisson R. E., Gallant J. E., Keruly J. C., Moore R. D. (1998) Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *AIDS.* 12:29-33
32. Chetkovich D. M., Sweatt J. D. (1993) NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *J. Neurochem.* 61:1933-42.
33. Chrysicopolous H. S., Press G. A., Grafe M. R., Hesselink J. R., Wiley C. A. (1990) Encephalitis caused by human immunodeficiency virus. CT and MR imaging manifestations with clinical and pathology correlation. *Radiology*, 175: 185-191.
34. Clarke J.R., McClure M. O. (1999) HIV-1 viral load testing. *J. Infect.* 38:141-146
35. Collingridge G. L., Kehl S. J., and McLennan H. (1983). The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J Physiol (Lond)*, 334:19-31.
36. Coutlee F., Olivier C., Cassol S., Voyer H., Kessous-Elbaz A., Saint-Antoine P., He Y., Fauvel M. (1994) Absence of prolonged immunosilent infection with human immunodeficiency virus in individuals with high-risk behaviors. *Am. J. Med.* 96:42-48.
37. Curran J. W., Jaffe H. W., Hardy A. M., Morgan W. M., Selik R. M., Dondero T. J. (1988) Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science*, 239:610-616.

38. Darko D. F., McCutchan J. A., Kripke D. F., Gillin J. C., and Golshan S. (1992) Fatigue, sleep disturbances, disability, and indices of progression of HIV infection. *Am. J. Psychiatry*, 149: 514-520.
39. Darko D. F., Mitler M. M., and Henriksen S. J. (1995a) Lentiviral infection, immune peptides and sleep. *Adv. Neuroimmunol.* 5: 57-77.
40. Darko D. F., Miller J. C., Gallen C., White J., Koziol J., Brown S.J., Hayduk R., Atkinson J. H., Assumus J., and Munnell D. T. (1995b) Sleep electroencephalogram delta-frequency, night plasma levels of tumor necrosis factor alpha, and human immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 12080-12084.
41. Darko D. F., Mitler M. M., Prospéro-García O., and Henriksen S. J. (1996) Sleep and lentivirus infection: Parallel observations obtained from human and animal studies. *SRS Bulletin*, 2:43-51.
42. Davis S., Vanhoutte P., Pages C., Caboche J., Laroche S. (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 20:4563-72.
43. Demaria S. and Bushkin Y. (1996) Soluble CD4 induces the binding of human Immunodeficiency virus type I to cell via the V3 loop of glycoprotein 120 and specific sites in glycoprotein 41. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 12: 281-290.
44. Desrosiers R. C. (1990) The simian immunodeficiency viruses. *Ann Rev Immunol*, 8: 557-578.
45. Di Stefano M., Wilt S., Gray F., Dubois-Dalco M. and Chiodi F. (1996) HIV type I V3 sequences and the development of Dementia during AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 12: 471-476.
46. Dreyer E. B., Kaiser P. K., Offermann J. T., and Lipton S. A., (1990) HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists, *Science*, 248: 364-367.
47. Drucker-Colín R., and García-Hernández F. (1991) A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *J. Neurosci. Methods*, 39: 153-161.
48. Elder G. A. and Sever J. L. (1988) AIDS and neurological disorders: an overview. *Ann. Neurol.* 23: s4-s6.
49. Epstein L. G., Sharer L. R., and Goudsmith J. (1998) Neurological and neuropathological features of human immunodeficiency virus infection in children. *Ann. Neurol.* 23: 519-523.
50. Everall I. P., Hudson L., Al-Sarraj S., Honavar M., Lantos P., and Kerwin R. (1995) Decreased expression of AMPA receptor messenger RNA and protein in AIDS: a model for HIV-associated neurotoxicity. *Nature Med.* 1: 1174-1178.
51. Fauci A. S. (1993) Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science*, 262:1011-1018
52. Fouchier R. A. M., Groenink M., Koottstra N. A., Termette M., Huisman H. G., Miedema F., and

- Schuitemaker H. (1992) Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type I gp120 molecule. *J. Virol.* 66: 3183-3187.
53. Gendelman H. E., Lipton S. A., Tardieu M., Bukrinsky M. I., and Nottet H. S. L. M. (1994) The neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* 56: 389-398.
54. Glowa J. R., Panlilio L. V., Brenneman D. E., Gozes I., Fridkin M., and Hill J. M. (1992) Learning impairment following intracerebral administration of the HIV envelope protein gp120 or a VIP antagonist. *Brain Res.* 570: 49-53.
55. Grant I., Atkinson J., Kesselink J. R. (1987) Evidence of early central nervous system involvement in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and other human immunodeficiency. *Ann. Intern. Med.* 107: 828-836.
56. Greene W.C. (1991) The molecular biology of human Immunodeficiency Virus type-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324; 308-317.
57. Gurwitz D. and Kloog Y. (1998) Do endogenous cannabinoids contribute to HIV-mediated immune failure?. *Mol. Med. Today*, May, 196-200.
58. Hargreaves E. L., Cote D., Shapiro M. L. (1997) A dose of MK801 previously shown to impair spatial learning in the radial maze attenuates primed burst potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Behav. Neurosci.* 111:35-48.
59. Henriksen S. J., Prospéro-García O., Phillips, T. R., Fox H. S., Bloom F. E. and Elder J. H. (1995) Feline immunodeficiency virus as a model for study of lentivirus infection of the central nervous system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 202: 167-186.
60. Hessol N. A., Koblin B. A., vanGriensven G. J., Bacchetti P., Liu J. Y., Stevens C. E., Coutinho R. A. (1994) Progression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection among homosexual men in hepatitis B vaccine trial cohorts in Amsterdam, New York City, and San Francisco, 1978-1991. *Am. J. Epidemiol.* 139:1077-1087.
61. Hill J. M., Mervis R. F., Avidor R., Moody T. W., and Brenneman D. E. (1993) HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates. *Brain Res.* 603: 222-233.
62. Hoffman T. and Doms C. (1998) Chemokines and coreceptors in HIV/SIV-host interactions, *AIDS*, 12: s17-s26.
63. Huang Y. Y., Kandel E. R. (1994) Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn. Mem.* 1:74-82.
64. Ickovics J. R., Ethier K. A., Koenig L. J., Wilson T. E., Walter E. B., Fernandez M. I. (2000) Infant

- birth weight among women with or at high risk for HIV infection: the impact of clinical, behavioral, psychosocial, and demographic factors. *Health Psychol.* 19:515-23.
65. Ishida T., Washizu T., Toriyabe K. M., Motoyoshi S., Tomoda I., and Pedersen N. C. (1989) Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194: 221-225.
 66. Jassen R. S., Cornblat D. R., Epstein L. G., McArthur J., and Price R.W. (1989) Human immunodeficiency virus (HIV) infection and the nervous system: report from the American Academy of Neurology, AIDS task force. *Neurology*, 39: 119-122.
 67. Jassen R. S., Nwyanwu O. C., Selik R. M., and Stehr-Green J. K. (1992) Epidemiology of human immunodeficiency virus encephalopathy in the United States. *Neurology*, 42: 1472-1476.
 68. Johnson R. T., McArthur J. C. and Naravan O. (1988) The neurobiology of human immunodeficiency virus infection. *FASEB J.* 2: 2970-2981.
 69. Kahn J. O., Walker B. D. (1998) Acute human immunodeficiency virus type I infection. *N. Engl. J. Med.* 339: 33-39.
 70. Kay D. G., Gravel C., Robitaille Y., Jolicoeur P. (1991) Retrovirus-induced spongiform myeloencephalopathy in mice: regional distribution of infected target cells and neuronal loss occurring in the absence of viral expression in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1281-1285.
 71. Kestler H., Kodama T., Ringler D., Marthas M., Pedersen N., Lackner A., Regier N., Sehgal P., Daniel M., King N., and Desrosier R. (1990) Induction of AIDS in Rhesus Monkeys by molecular cloned simian immunodeficiency virus. *Science*, 248: 1109-1111.
 72. Ketzler S., Weiss S., Haug H., Budka H. (1990) Loss of neurons in the frontal cortex in AIDS brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 80: 92-94.
 73. Kieny M. P. (1990) Structure and regulation of the human AIDS virus. *J Acquir Immune Defic Synd.* 3:395-402.
 74. Klein R. S., Williams K. C., Alvarez-Hernandez X., Westmoreland S., Force T., Lackner A. A., and Luster A. D. (1999) Chemokine Receptor Expression and Signaling in Macaque and Human Fetal Neurons and Astrocytes: Implications for the Neuropathogenesis of AIDS. *The Journal of Immunology*, 199, 163: 1636-1646
 75. Krucker T., Toggas S. M., Mucke L., and Siggins G. R. (1998) Transgenic mice with cerebral expression of human immunodeficiency virus type-1 coat protein gp120 show divergent changes in short- and long-term potentiation in CA1 hippocampus. *Neuroscience*, 83: 691-700.
 76. Kubicki S., Henkes H., Terstegge K., and Ruf B. (1988) AIDS related sleep disturbances- A preliminary report. In: *HIV and Nervous system* (Kubicki, S. Ed), pp: 97-105. New York
 77. Kunz D., Herrmann W. M. (2000) Sleep-wake cycle, sleep-related disturbances, and sleep disorders:

- a chronobiological approach. *Compr Psychiatry* (2 Suppl 1):104-115.
78. Kwong P. D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R. W., Sodroski J., and Hendrickson W. A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 93: 648-659.
 79. Lackner A. A., Smith M. O., Munn R. J., Marx D. J., Gardener M. B., and Dandekar S. (1991) Localization of simian immunodeficiency virus in the central nervous system of Rhesus monkey. *Am. J. Pathol.* 139: 609-621.
 80. Lang W., Perkins H., Anderson R. E. (1989) Patterns of T-lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2: 63-69.
 81. Lannuzel A., Lledo P. M., Lamghitnia H. O., Vincent J. D., and Tardieu M. (1995) HIV-envelope proteins gp120 and gp160 potentiate NMDA-induced $(Ca^{2+})_i$ homeostasis and induce neurotoxicity in human embryonic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7: 225-2293.
 82. Layne S. P., Merges M. J., Dembo M., Spouge J. L., Conley S. R., Moore J. P., Raina J. L., Rena H., and Nara P. L. (1992) Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology*, 189: 695-714.
 83. Levy J. A. (1993) Pathogenesis of HIV infection. *Microbiol. Rev.* 57:183-289.
 84. Levi G., Patrizio M., Bernardo A., Petrucci T. C., and Agresti C. (1993) Human immunodeficiency virus coat protein gp120 inhibits the β -adrenergic regulation of astroglial and microglial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 1541-1545.
 85. Lipton S. A. and Gendelman H. E. (1995) Dementia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 332: 934-940.
 86. Lipton S. A. (1991) Calcium channel antagonists and human immunodeficiency virus coat protein-mediated neuronal injury. *Ann. Neurol.* 30: 110-114.
 87. Lipton S. A. (1994) AIDS-related dementia and calcium homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 747: 205-224.
 88. Lipton S. A. (1998) Neuronal injury associated with HIV-1: Approaches to treatment. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 159-177.
 89. Luster A. D. (1998) Mechanisms of Disease: Chemokines -- Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *The New England Journal of Medicine*, No. 72;338(7):436-45).
 90. Lynch G. (1998) Memory and the Brain: Unexpected chemistries and a New Pharmacology. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70: 82-100.
 91. Maini C. L., Pigorini F., Pau F. M. (1990) Cortical cerebral blood flow in HIV-1 related dementia

- complex. *Nucl. Med. Commun.* 11: 639-648.
92. McLay R. N., Freeman S. M., Harlan R. E., Kastin A. J., Zadina J. E. (1999) Tests used to assess the cognitive abilities of aged rats: Their relation to each other and to hippocampal morphology and neurotrophin expression. *Gerontology*, 45: 143-155.
 93. Mellors J. W. (1995) Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann. Intern. Med.* 122: 573-579.
 94. Meucci O., Fatatis A., Simen A. A., Bushell T. J., Gray P. W., and Miller R. J. (1998) Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14500-14505.
 95. Miyazawa T., Tomonaga K., Kawaguchi Y., Mikami T. (1994) The genome of feline immunodeficiency virus. *Arch Virol* 134: 221-34
 96. Moeller A. A., Oechsner M., Backmund H. C., Popescu M., Emminger C. and Holsboer E. (1991) Self-Reported sleep quality in HIV infection: Correlation to the stage of infection and Zidovudine therapy. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 4: 1000-1003.
 97. Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S., and Baudry M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319: 774-776.
 98. Morris R. G. M., Garrud P., Rawlind J. N. P., and O'Keefe J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297: 681-683.
 99. Müller R. V., Kubie J. L., Bostock E. M., Staube J. S. and Quirk G. J. (1991) Spatial firing correlates of neurons in the hippocampal formation of freely moving rats. In *Brain and Space*, Ed: Jacques Paillard; New York, Oxford University Press, pp:297-333.
 100. Navia B. A., Eun-Sook C., Petit C., Price R. W. (1986) The AIDS dementia complex. II. *Neuropathology Ann Neurol*, 19: 525-535.
 101. Newman S. P., Lunn S., and Harrison M. J. G. (1995) Do asymptomatic HIV-seropositive individuals show cognitive deficit?. *AIDS*, 9: 1211-1220.
 102. Nguyen P. V. and Kandel E. R. (1996) A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16: 3189-3198.
 103. Norman S. E., Chediak A. D., Kiel M., and Cohn M. A. (1990) Sleep disturbances in HIV-infected homosexual men. *AIDS*, 4: 775-781.
 104. Norman S. E., Chediak A. D., Freeman C., Kiel M., Mendez A., Duncan R., Simoneau J., and Nolan B. (1992) Sleep Disturbances in men with asymptomatic human immunodeficiency (HIV)

- infection. *Sleep*, 15: 150-155.
105. Oh S. K., Cruikshank W., Raina J., Blanchard G. C., Adler W. H., Alker J., and Kornfield H. (1992) Identification of HIV-1 envelope glycoprotein in the serum of AIDS and ARC patients, *J. Acqu. Immun. Synd.* 5:251-256.
 106. O'Gorman M. R. G., Weber D., Landis S. E., Schoenbach V. J., Mittal M., Folds J. D. (1991) Interpretive criteria of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type I infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115:26-30.
 107. Otmakhova N. A., Otmakhov N. Mortenson L. H., and Lisman J. E. (2000) Inhibition of the cAMP Pathway Decreases Early Long-Term Potentiation at CA1 Hippocampal Synapses. *J. Neurosci.* 20:4446-4451.
 108. Opp M. R., Rady P. L., Hughes T. K., Cadet P., Tying S. K., and Smith E. M. (1996) Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120 alters sleep and induces cytokine mRNA expression in rats. *Am. J. Physiol.* 270: R963-R970.
 109. Pantaleo G., Graziosi C., and Demarest J. F. (1993) HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinical latent stage of disease. *Nature*, 362: 355-358.
 110. Pattarini R., Pittaluga A., and Raiteri M. (1998) The human immunodeficiency virus-1 envelope protein gp120 binds through its V3 sequence to the glycine site of N-methyl-D-aspartate receptor mediating noradrenaline release in the hippocampus. *Neuroscience*, 87: 147-157.
 111. Paxinos G. and Watson C. (1986) *The rat Brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press Inc. Second edition.
 112. Pedersen N. C., Ho, E. W., Brown M. L., and Yamamoto, J. K. (1987) Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*. 235: 790-793.
 113. Persidsky Y., Nottet H. S., Sasseville V., Epstein L. G. and Gendelman H. E. (1995) The development of animal model system for HIV-1 encephalitis and its associated dementia. *J. Neurovirol.* 1: 229-243.
 114. Phillips A. N., Elford J., Sabin C., Bofill M., Janossy G., Lee C. A. (1992) Immunodeficiency and the risk of death in HIV infection. *JAMA*. 268:2662-2666.
 115. Phillips T. R., Prospéro-García O., Puaoli D. L., Lerner D. L., Fox H. S., Olmsted R. A., Bloom F. E., Henriksen S. J., Elder J. H. (1994) Neurological abnormalities associated with feline immunodeficiency virus infection. *J. Gen. Virol.* 75: 979-987.
 116. Phillips T. R., Prospéro-García O., Wheeler D. W., Wagaman P. C., Lerner D. L., Fox H. S., Whalen L. R., Bloom F. E., Elder J. H., and Henriksen S. J. (1995) Neurologic dysfunction caused by

- a molecular clone of feline immunodeficiency virus, FIV-PPR. *J. Neurovirol.* 2: 338-396.
117. Portegies P. (1994) AIDS dementia complex: a review. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* 7(suppl 2):S38-S49.
 118. Power C., McCarthur J. C., Johnson R. T., Griffin D. E., Glass J. D., Perryman S. and Chesebro B. (1994) Demented and nondemented patients with AIDS differ in brain-derived human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences. *J. Virol.* 68: 4643-4649.
 119. Power C., and Johnson R. T. (1995) HIV-1 Associated dementia: clinical features and pathogenesis. *Can. J. Neurol. Sci.* 22: 92-100.
 120. Price R. W., Brew B., Sidtis J., Rosenblum M., Scheck A. C., and Cleary P. (1988) The brain and AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 239: 586-592.
 121. Prospéro-García O., Gold L. H., Fox H. S., Ilham P., Koob G. F., Bloom F. E., and Henriksen S. J. (1996) Microglia-passaged simian immunodeficiency virus induces neurophysiological abnormalities in monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 14158-14163.
 122. Prospéro-García O., Herold N., Phillips T. R., Elder J. H., Bloom F. E. and Henriksen S. J. (1994a) Sleep patterns are disturbed in cats infected with feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12947-12951.
 123. Prospéro-García O., Herold N., Waters A. K., Phillips T. R., Elder J. H., and Henriksen S. J. (1994b) Intraventricular administration of a FIV-envelope protein induces sleep architecture changes in rats. *Brain Res.* 659: 254-258.
 124. Prospéro-García O., Huitrón-Resendiz S. C., Casalman S., Sánchez-Alavez M., Díaz-Ruiz O., Navarro L., Lerner D. L., Phillips T. R., Elder J. H., and Henriksen S. J. (1999) Feline Immunodeficiency virus envelope protein (FIVgp120) causes electrophysiological alterations in rats. *Brain Res.* 836: 203-209.
 125. Prospéro-García O., Navarro L., Murillo-Rodríguez E., Sánchez-Alavez M., Guzmán-Marín R., Méndez-Díaz M., Gómez-Chavarín M., Jiménez-Anguiano A., and Drucker-Colín R. (1999) Cellular and molecular changes occurring during REM sleep. In: Rapid Eye Movement Sleep (B. N. Mallick and S. Inoué, Eds) pp, 367-381. Narosa Publishing House, New Delhi, India.
 126. Pulliam L., Clarke J. A., McGrath M. S., Moore D., and McGuire D. (1996) Monokine products as predictor of AIDS dementia. *AIDS*, 10: 1495 -1500.
 127. Pulliam L., Gascon R., Stubblebine M., McGuire D., McGrath M. S. (1997) Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet*, 349: 692-695.
 128. Quinn T. C. (1997) Acute primary HIV infection. *JAMA.* 278 58-62.
 129. Resink A., Villa M., Boer G. J., Mohler II., Balazs R. (1995) Agonist-induced down-regulation of

- NMDA receptors in cerebellar granule cells in culture. *Eur. J Neurosci.* 7:1700-6.
130. Resink A., Villa M., Benke D., Hidaka H., Mohler H., Balazs R. (1996) Characterization of agonist-induced down-regulation of NMDA receptors in cerebellar granule cell cultures. *J. Neurochem.* 66:369-77
 131. Roehrs T., and Roth T. (2000) Sleep-wake state and memory function. *Sleep* (23):S64-8.
 132. Ruff M. R., O'Neil J. B., Barbour G., Mayer K., Moon M., Huyett J., Heseline P., Bridge T. P., and Pert C. B. (1990) A pathogenic fragment of gp120 is concentrated in HIV plasma and CSF. *VI Int Conf AIDSS*, 2:350, (abstr. 1147).
 133. Saags M. S., Holodniy M., Kuritzkes D. R., O'Brien W. A., Coombs R., Poscher M. E., Jacobsen D. M., Shaw G. M., Richman and Volberding P. A.: HIV viral load markers in clinical practice. *Nat. Med.* 2: 625-629.
 134. Saag M. S., Hammer S. M., Lange J. M. (1994) Pathogenicity and diversity of HIV and implications for clinical management: a review. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 7(suppl 2):S2- S11.
 135. Sanders V. J., Pittman C. A., White M. G., Wang G., Wiley C. A., Achim C. L. (1998) Chemokines and receptors in HIV encephalitis. *AIDS*, 12:1021-1026.
 136. Shapiro M. L. and Eichenbaum H. (1999) Hippocampus as a memory map: Synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus.* 9:365-384.
 137. Schulz S., Siemer H., Krug M., and Höllt V. (1999) Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 19: 563-5692.
 138. Schupbach J., Tomasik Z., Nadal D., Ledergerber B., Flepp M., Opravil M., Boni J. (2000) Use of HIV-1 p24 as a sensitive, precise and inexpensive marker for infection, disease progression and treatment failure. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16:441-5.
 139. Segal M. and Murphy D. D. (1998) CREB activation mediates plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neural. Plast.* 6: 1-7.
 140. Silva A. J., Giese K. P., Fedorov N. B., Frankland P. W., and Kogan J. H. (1998) Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning, *Neurobiol. Learn. Mem.* 70:44-61, 1998.
 141. Skagaggs W. E., and McNaughton B. L. (1996) Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experiences. *Science.* 271: 1870-1873.
 142. Sloand E. M., Pitt E., Chiarello R. J., Nemo G.J. (1991) HIV testing: State of the art. *JAMA.* 266:2861-2866.
 143. Smith T., Jacobsen J., Trojaborg W. (1990) Myelopathy and HIV infection. *AIDS.* 4: 589-591.
 144. Srinivasan A., Dorsett D., York D., Bohan C., Anand R. (1988) Human immunodeficiency virus

- replication in human brain cells. Brief report. *Arch Virol* 99(1-2):135-41.
145. Steele R. J. and Morris R. G. (1999) Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*. 9: 118-136.
 146. Tenner-Racz K., Stellbrink H. J., van Lunzen J., Schneider C., Jacobs J. P., Raschdorff B., Grosschupff G., Steinman R. M., Racz P. (1998) The unenlarged lymph node. The unenlarged lymph nodes of HIV-1-infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.* 187:949-959
 147. Toggas S. M., Masliah E., Rockenstein E. M., Rall G. F., Abraham C. R., and Mucke L. (1994) Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature*, 371, 188-193.
 148. Toggas S. M., Masliah E., and Mucke, L. (1996) Prevention of HIV-1 gp120-induced neuronal damage in the central nervous system of transgenic mice by the NMDA receptor antagonist memantine. *Brain Res.* 706: 303-307.
 149. Tsoukas C. M., Bernard N. F. (1994) Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:14-28.
 150. Ursin, R., and Serman, M. B. (1981) *A Manual for Standard Scoring of Sleep and Waking States in the Adult Cat.* Univ. Calif., Los Angeles, USA.
 151. Vallat A. V., De Girolamo U., He J., Mhashilkar A., Marasco W., Shi B., Gray F., Bell J., Keohane C., and Smith T. W. (1998). Localization of HIV-1 coreceptors CCR5 and CXCR4 in the brain of children with AIDS. *Am. J. Pathol.* 152:167.
 152. Wesselingh S. L., Power C., Glass J. L. (1993) Intracerebral cytokine messenger RNA expression in acquired immunodeficiency syndrome dementia. *Ann. Neurol* 33: 576-582.
 153. Wesselingh S. L., Tyor W. R., and Griffin D. E. (1996) Cytokines and HIV-Associated Dementia. In *Cytokines and the CNS* edited by Ransohoff R. M. and Benveniste E. N., CRC Press. 287-306.
 154. Whishaw I. Q. and Gorny B. (1999) Path integration absent in Scent-tracking fimbria-fornix rats: Evidence for hippocampal involvement in "Sense of direction" and "sense of distance" using self-movement cues. *J. Neurosci.* 19: 4662-4673.
 155. White J. L., Darko D. F., Brown S. J., Miller J. C., Hayduk R., Kelly T., and Mitler M. M. (1995) Early central nervous system response to HIV infection: sleep distortion and cognitive-motor decrements. *AIDS*, 9: 1043-1050.
 156. Wiegand M., Moller A. A., Schreiber W., Krieg J. C., Holsboer F. (1991) Alterations of nocturnal

- sleep in patients with HIV infection. *Acta Neurol. Scand.* 83: 141-142.
157. Wiley C. A., Masliah E., Morey M. (1991) Neocortical damage during HIV infection. *Ann Neurol.* 29: 651-657, 1991.
 158. Wiley C. A., Soontornniyomkij V., Radhakrishnan L., Masliah E., Mellors J., Hermann S. A., Dailey P., and Achim C. L. (1998) Distribution of brain HIV load in AIDS. *Brain. Pathol.* 8: 277-284.
 159. Westphal R. S., Tavalin S. J., Lin J. W., Alto N. M., Fraser I. D., Langeberg L. K., Sheng M., Scott J. D. (1999) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science*, 285:93-6.
 160. Westmoreland S. V., Rottman J. V., Williams K. C., Lackner A. A., y Sasseville, V. G, (1998). Chemokine receptor expression on resident and inflammatory cells in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am. J. Pathol.* 152:659,
 161. Wolkinsky S. M., Rinaldo C. R., Kwok S. (1989) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection a median of 18 months before a diagnostic western blot. Evidence from a cohort of homosexual men. *Ann. Intern. Med.* 111: 961-972.
 162. Working Group of the American Academy of Neurology AIDS Task Force (1991) Nomenclature and research case definitions for neurologic manifestations of human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection. *Neurology.* 41:778-785.
 163. Wong S. T., Athos J., Figueroa X. A., Pineda V. V., Schaefer M. L., Chavkin C. C., Muglia L. J., Storm D. R. (1999) Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron*, 23:787-98.
 164. Xia Z. G., Refsdal C. D., Merchant K. M., Dorsa D. M., Storm D. R. (1991) Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase in rat brain: expression in areas associated with learning and memory. *Neuron*, 6:431-43.
 165. Xia Z. G. and Storm D. R. (1997) Calmodulin-regulated adenylyl cyclases and neuromodulation. *Current Opinion in Neurobiology* 7:391-396.
 166. Young B., Kuritzkes D. R. (1999) Viral kinetics: implications for treatment. *AIDS.* 13:S11-7.
 167. Zheng, J., Thylin, M. R., Ghorpade, A., Xiong, H., Persidsky, Y., Cotter, R., Niemann, D., Che, M., Zeng, Y. C., Gelbard, H. A., Shepard, R. B., Swartz, J. M., Gendelman, H. E. (1999a) Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia. *J. Neuroimmunol.* 98, 185-200.
 168. Zheng, J., Ghorpade, A., Niemann, D., Cotter, R. L., Thylin, M. R., Epstein, L., Swartz, J. M., Shepard, R. B., Liu, X., Nukuna, A., Gendelman, H. E. (1999b) Lymphotropic virions affect

chemokine receptor-mediated neural signaling and apoptosis: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia. *J. Virol.* 73, 8256-67.