

El cobre en la neurofisiología del hipocampo

Copper and hippocampus neurophysiology

Juan Leiva R.¹ y Mario Palestini Q.²

Copper is an oligoelement essential for various enzymatic processes both in pathology and in human physiology. Its excessive accumulation in the liver and brain, particularly in the basal ganglia drives to the pathological syndrome known as Wilson's disease, on the other hand, this metal absence in the newborn provokes brain and cerebellar degeneration, pathology recognized as Menkes' disease. Currently its role in Parkinson, Alzheimer and lateral amyotrophic sclerosis is discussed. Our studies in rats about the copper effects in the hippocampus excitability, long term potentiation (LTP) and learning have shown a suppressor action on LTP, without memory alteration nor on the animal learning in the Morris' aquatic maze, a physiological paradoxical result and in its clinical inference also.

Key words: Copper, hippocampus, neurophysiology.
Rev Chil Neuro-Psiquiat 2012; 50 (3): 158-165

Introducción

El cobre, a lo largo de la historia de la humanidad, no sólo ha sido un factor central en el desarrollo social y evolutivo del hombre, sino también un elemento imprescindible en el mantenimiento y balance orgánico de muchas estructuras y procesos en nuestro ambiente, de allí su amplia presencia en diversas formas y concentraciones en océanos, suelos y plantas.

El cobre es parte integral de varias proteínas y es también un co-factor necesario para el funcionamiento de diversas reacciones enzimáticas. Se acepta comúnmente que el cobre puede reaccionar ávidamente con proteínas y unirse a tio-latos, aminas y grupos carboxílicos presentes en

macromoléculas¹. Las acciones de este metal son extremadamente útiles para el funcionamiento de la citocromo oxidasea C, metallothioneína, super óxido dismutasa, dopamina beta hidroxilasa, tirosinasa, lisil oxidasa, factor de coagulación V y factor VIII. En este mismo sentido, se ha establecido que el cobre está comprometido en los mecanismos de defensa, fortalecimiento óseo, maduración de los glóbulos rojos y leucocitos, en el transporte del hierro, en el metabolismo del colesterol, contractibilidad cardíaca, metabolismo de la glucosa y desarrollo cerebral²⁻⁴.

En 1912 Kinnier Wilson describió en su monografía "Progressive lenticular degeneration" un cuadro degenerativo hereditario recesivo que comprometía primariamente el hígado, el sistema

Recibido: 15/03/2012

Aprobado: 1/06/2012

Sin apoyo financiero.

¹ Profesor de Biología y Ciencias. Programa de Fisiopatología, ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Médico Cirujano. Psiquiatra. Programa de Fisiopatología, ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

nervioso y que, invariablemente, llevaba a la muerte. Fue solamente en 1984 que el cobre fue identificado como el elemento tóxico de la enfermedad de Wilson, cuando una falla en la secreción biliar del elemento conducía a la acumulación del metal en hígado y cerebro, particularmente en el núcleo lenticular de los ganglios basales⁵.

En el año 1962, Menkes describió en dos niños una patología hereditaria recesiva ligada al sexo caracterizada por un retardo físico, degeneración cerebral y cerebelosa que rápidamente evolucionaba a una decerebración y muerte⁶. Más recientemente, la enfermedad de Menkes fue asociada al cobre, debida en este caso a una alteración en la absorción del metal. De este modo, la excesiva acumulación de cobre del Wilson, como la ausencia del metal en el recién nacido impactarán preferentemente el sistema nervioso generando cuadros neurológico y psiquiátricos.

En el presente, se discute el papel del cobre en patologías tales como el Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica^{3,4,7}.

Estos antecedentes, más una acusación que se hizo en el Organismo Mundial de la Salud por parte de organizaciones médicas alemanas sobre intoxicaciones hepáticas en niños, causadas, según ellos, por cobre en el agua potable, nos motivó a iniciar estudios sobre el efecto de este elemento en el sistema nervioso, más específicamente en el hipocampo.

Material y Método

Elegimos el hipocampo por ser un órgano muy sensible a las injurias tóxicas, por su importancia en los mecanismos de la memoria, por ser una de las primeras estructuras que se alteran en el Alzheimer y por que el hipocampo, junto con el striatum son las estructuras cerebrales que concentran la mayor densidad de cobre, 34,0 µg/g en tejido seco⁸. Por otra parte, existen antecedentes experimentales que demuestran que el cobre puede ser liberado durante la actividad sináptica⁹ alcanzando niveles de 100 µM en la hendidura sináptica⁹⁻¹².

Desde el punto de vista técnico, el hipocampo

por su ubicación en el cerebro de la rata y por su morfología, suele ser el elegido para los estudios de rebanadas de cerebro. En estas preparaciones, las rebanadas de hipocampo son de 400 µ y se colocan en un baño con Ringer-Krebs burbujeante con 95% de O₂, 5% de CO₂, a temperatura de 36° C.

Esta técnica tiene la ventaja y posibilidad de mantener por muchas horas las respuestas sinápticas y se puede introducir en el baño diversas sustancias neuroactivas, como neurotransmisores o soluciones metálicas como el cobre como en nuestro estudio. Estos experimentos tienen limitaciones obvias, donde no es posible estudiar los efectos provenientes de las distintas estructuras que proyectan al hipocampo.

Estudio de la acción directa del cobre

En la primera etapa, nuestra investigación se orientó al estudio de la acción del metal en la actividad sináptica de rebanadas de la zona CA1 del hipocampo⁹. Los registros con microelectrodos extracelulares de los potenciales de campo (PC) de esa zona, fueron notoriamente disminuidos de amplitud de modo semejante al efecto GABA sobre los PC en igual zona hipocámpica²¹. La conclusión nos pareció obvia: el cobre ejerce una acción inhibitoria sobre las sinapsis de CA1, ya sea por intermedio de un efecto GABA o por acción directa del cobre sobre esta sinapsis. Esta conclusión, como veremos más adelante, no era tan obvia; había otras interpretaciones (Figura 1).

Respuesta a la estimulación repetitiva

La LTP se define operacionalmente como un aumento de larga duración de la eficacia sináptica como consecuencia de la estimulación eléctrica de alta frecuencia (estimulación tetánica) de fibras aferentes^{10,11}.

La evidencia de la acción del cobre en la actividad sináptica del hipocampo y la participación de esta estructura en la memoria y el aprendizaje, nos indujo a estudiar una respuesta electrofisiológica

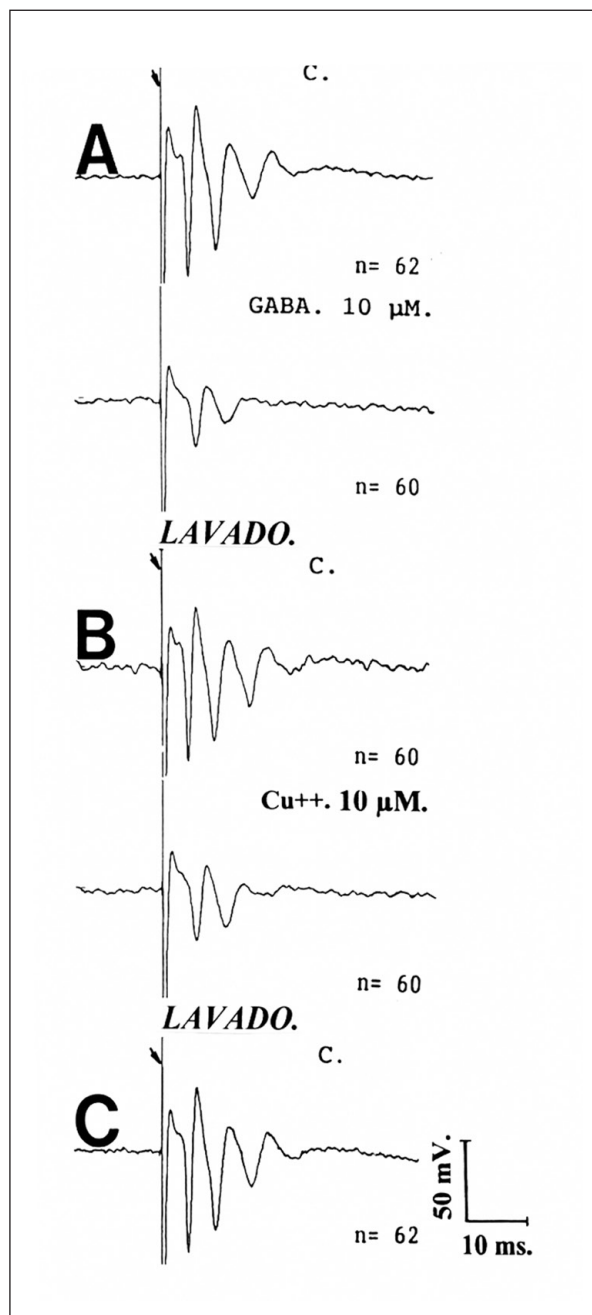


Figura 1. Efecto del cobre sobre el potencial sináptico de campo promedio PC ($n = 60$) en rebanadas de hipocampo de rata. Registros A, B y C muestran los promedios de registros controles. Los registros intermedios muestran los efectos depresores del GABA, y cobre 10 min, luego de iniciada la perfusión del cobre y neurotransmisor por separado. La flecha señala el artefacto de estímulo que genera el PC. Note que el PC retornó a la respuesta control de inicio. Todos los registrados mostrados provienen de la misma rebanada de hipocampo.

que diera cuenta de la capacidad plástica de esta región cerebral. Este mecanismo electrofisiológico es la potenciación de larga duración LTP del inglés long-term potentiation.

Las rebanadas de hipocampo fueron sometidas a la estimulación tetánica de las fibras colaterales de Schaffer, mientras que las respuestas eran registradas en las neuronas piramidales de CA1, donde las fibras aferentes de Schaffer hacen sinapsis.

Con esta técnica obteníamos una constante y reproducible LTP. Después de haber logrado una sostenida LTP, agregábamos al baño una solución de $10 \mu\text{M}$ de cobre, en estas condiciones, la LTP prácticamente desaparecía. Como cabía la posibilidad que el metal hubiese dañado definitivamente la sinapsis, procedíamos a lavar el baño con Ringer-Krebs durante 40 min, obteniendo la certeza de eliminar cualquier residuo de cobre. Después de este procedimiento, la respuesta de campo reaparecía, incluso de mayor amplitud que la respuesta previa de control. Concluimos que esta depresión era funcional y apuntaba una vez más a un efecto GABA. Sin embargo, son numerosos los trabajos que atribuyen la LTP a la acción de los neurotransmisores glutamatérgicos como NMDA y AMPA¹¹⁻¹³, por lo tanto, cabe pensar que el metal pudiera tener una acción doble⁹ (Figura 2).

Efectos del cobre sobre el aprendizaje y la memoria

En estos experimentos la solución de cobre, como se dijo, era colocada directamente al baño donde estaba la rebanada de hipocampo. Nos pareció entonces interesante estudiar la LTP hipocámpica en ratas que hubiesen recibido cobre al menos durante un mes.

En una serie experimental en ratas, se dejó que los animales bebieran *ad libitum* agua que contenía sulfato de cobre. Cada rata bebió entre 8 y 12 mg/día. Terminado este período, los hipocampos de estos animales fueron sometidos al estudio de la LTP, siguiendo las técnicas señaladas más arriba. Los resultados no difirieron de aquellos obtenidos en los experimentos agudos. En otras palabras, los hipocampos de estos animales no desarrollaron

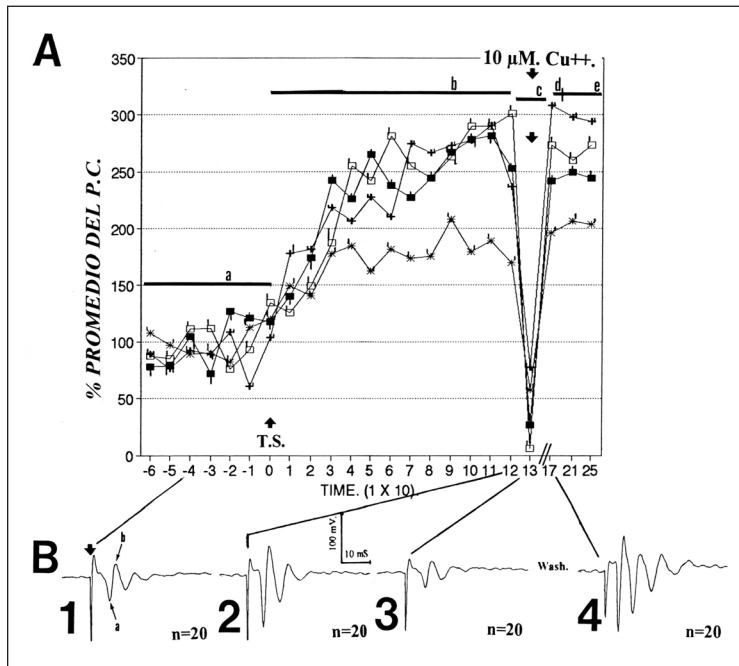


Figura 2. Efecto depresor del cobre sobre la respuesta sináptica, Potenciación de Larga Duración (LTP), obtenida desde neuronas de CA1 en rebanadas de hipocampo de rata. Registros en B.(1,2,3 y 4), muestran respuestas sinápticas de campo promedio (n = 20), obtenidas por estímulos umbrales señalados por la flecha gruesa. Note que el PC (2) aumenta en voltaje después de la Estimulación tetánica (ET) única, dada a tiempo 0, vale decir se expresa potenciación (LTP). El registro(3) exhibe una marcada reducción de la LTP por acción de 10 μM de cobre, 120 min luego de la ET. El Registro(4) presenta la LTP, luego de 40 min de iniciado el lavado del cobre. Note en este caso, el marcado incremento de la respuesta LTP en voltaje, duración, y número de inflexiones. El gráfico en A, exhibe la evolución del voltaje del PC, antes y después la ET.

una respuesta LTP. Este efecto del oligoelemento podría representar la interferencia del cobre en los receptores NMDA^{9,19} y si este era el caso, el cobre debería alterar el aprendizaje y la memoria.

Para poner a prueba esta hipótesis, nos propusimos estudiar el efecto del cobre en un modelo de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris por cuanto existe abundante literatura acerca de este test en estudios sobre aprendizaje visuo-espacial, hipocampo y LTP^{14,15}.

El laberinto de Morris consiste en una piscina redonda de 200 cm de diámetro y una profundidad de 50 cm. El baño era llenado con agua temperada a 25 ± 1°C y virtualmente dividido por dos ejes perpendiculares en cuatro áreas o cuadrantes denominados norte-sur-este-oeste. En uno de estos cuadrantes se colocaba una “isla” de 11 cm de diámetro semi sumergida 2 cm bajo la superficie del agua. Los ensayos consistían en liberar la rata desde el borde del baño en uno de los puntos cardinales y debía nadar hasta alcanzar la plataforma semi sumergida. Si en 2 min el animal no alcanzaba la plataforma se la tomaba y se la colocaba en la plataforma. De lunes a viernes se hacía diariamente 5 ensayos consecutivos. Todos los animales normales

terminaban la semana empleando 3 ó 4 segundos en alcanzar la plataforma.

En estos experimentos, el sulfato de cobre disuelto en suero fisiológico fue administrado a las ratas en una dosis de 1 mg/kg durante 30 días por vía intraperitoneal (ip). Todos los animales sometidos a este régimen y ensayados en el laberinto de Morris aprendieron en tiempos similares a los animales controles sin cobre (Figura 3).

Al terminar este período los hipocampos de estos animales fueron sometidos al estudio de LTP *in vitro*. Ninguna de las rebanadas de hipocampo de estos animales desarrolló LTP (Figura 4).

Con la colaboración del profesor Goldschmidt del Departamento de Geología de la Universidad de Chile, se determinó, utilizando un “microprobe,” la concentración de cobre en el hipocampo y corteza cerebral de estas ratas. Los análisis demostraron que la concentración del metal en las rebanadas de hipocampo de las ratas con cobre era 14,2 veces mayor que el encontrado en las ratas normales de control, y que en la corteza cerebral visual la concentración de cobre en las ratas experimentales era 16,7 veces mayor que en los animales normales de control^{25,26}.

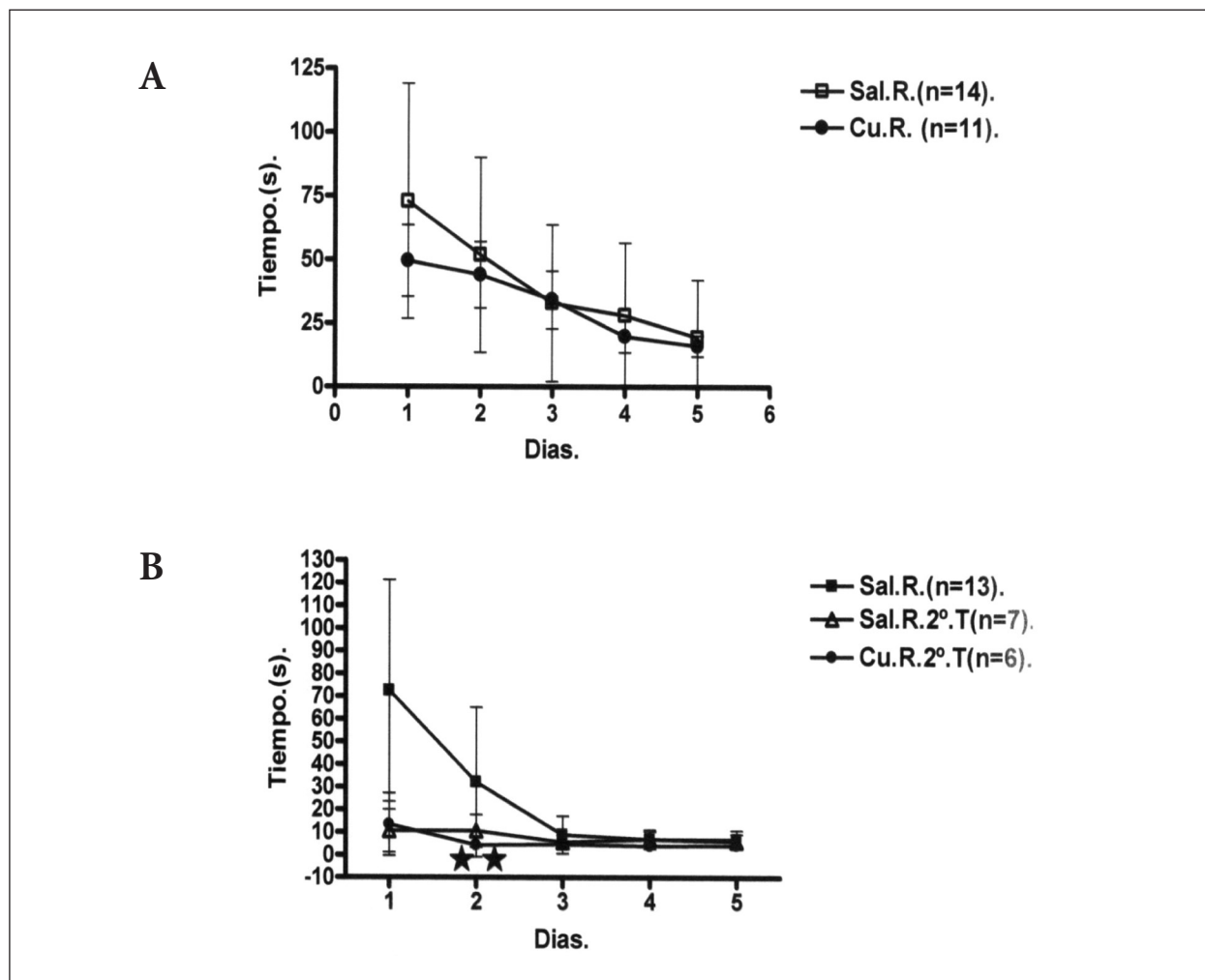


Figura 3. Análisis comparativo de las conductas de aprendizaje mediante el test acuático de Morris en ratas adultas Wistar. El gráfico superior (A) muestra en el eje de las ordenadas el tiempo promedio en s que demoraron 14 ratas controles en alcanzar la isla sumergida. Este grupo recibió un ml de suero fisiológico intra-peritoneal (ip), por 30 días consecutivos. Por otra parte, se muestra también el desempeño de 11 ratas que recibieron 1 mg/kg, de cobre disuelto en 1 ml de suero fisiológico ip, por 30 días consecutivos, previos al test de Morris. Cada rata de cada grupo fue impulsada a realizar el test, cinco veces consecutivas, por 5 días seguidos (eje de las abscisas). Note que, no existen diferencias significativas en el desempeño frente al aprendizaje entre el grupo control y el grupo con cobre. Ambos grupos aprenden de modo similar reduciendo los tiempos y mejorando el desempeño cada día. El cobre no muestra efectos sobre las conductas de aprendizaje. El gráfico inferior (B) muestra en el eje de las ordenadas el tiempo promedio en s, que demoraron 13 ratas controles en alcanzar la isla sumergida. Cada rata de éste grupo recibió por 30 días consecutivos un ml de suero fisiológico ip. Entonces, cada ejemplar fue impulsado a realizar el test de Morris, cinco veces consecutivas por 5 días seguidos (eje de las abscisas). Note que las 13 ratas mostraron reducciones significativas del tiempo promedio en el encuentro de la isla sumergida. Vale decir, el aprendizaje se ha instalado. El grupo de las 13 ratas con aprendizaje cimentado fue dividido en dos grupos. El Primer grupo (n=7), siguió recibiendo en forma consecutiva 1 ml de suero fisiológico ip, por 30 días más. El segundo grupo recibió 1 mg/kg, de sulfato de cobre disuelto en un ml de suero fisiológico ip, por 30 días adicionales. Entonces, cada rata de cada grupo fue impulsada a realizar el test de Morris. Ambos grupos de ratas mostraron tiempos de desempeño muy similares a los observados durante el último día del primer aprendizaje. Vale decir, el cobre no alteró la memoria cimentada en la primera secuencia de aprendizaje, tampoco el tiempo transcurrido desde el primer aprendizaje (30 días) alteró los tiempos de recorrido. Incluso, el segundo día de la segunda secuencia de aprendizaje, los ejemplares del grupo con cobre mostraron un significativo mejor desempeño que los ejemplares sin cobre.

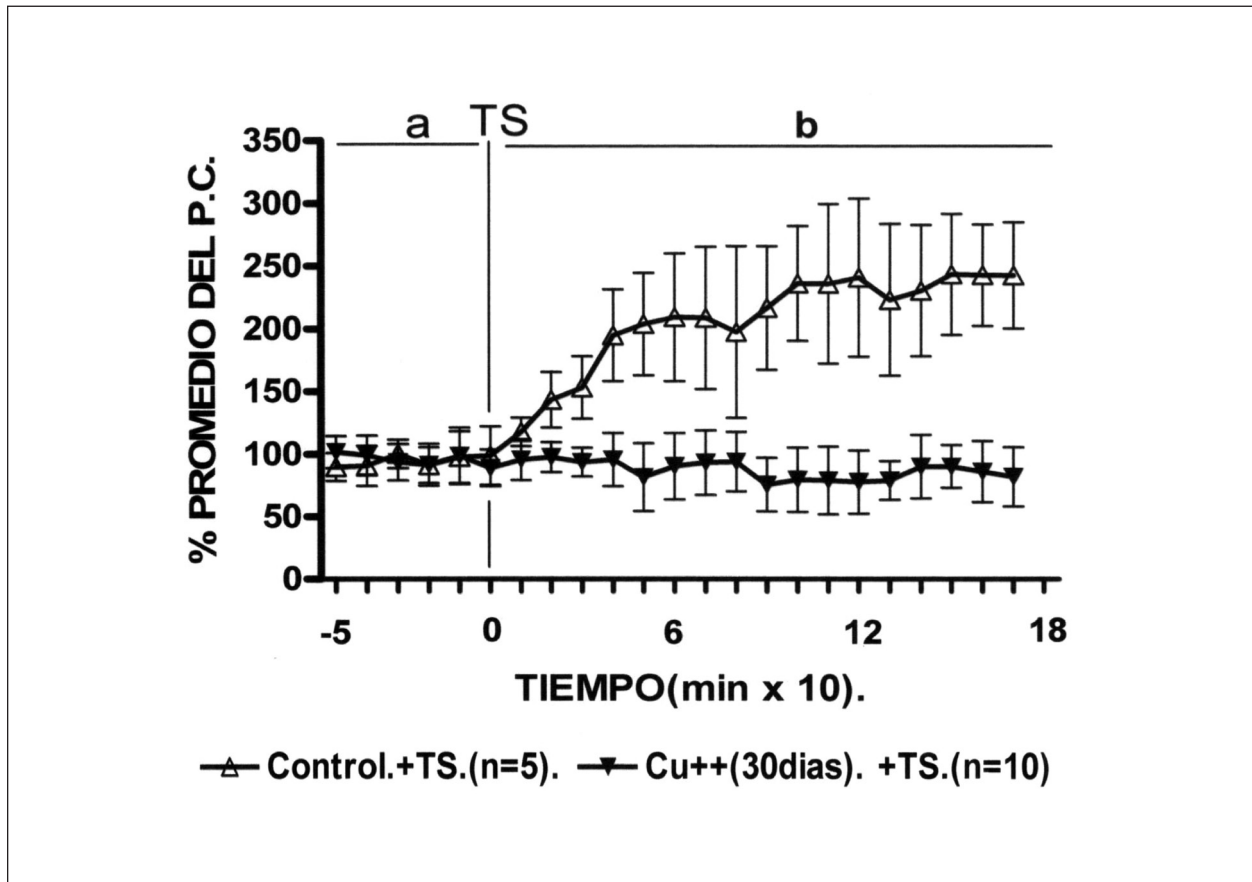


Figura 4. Acción del cobre crónico, sobre la LTP, en neuronas de CA1, procedentes de rebanadas de hipocampo de ratas adultas Wistar (recibieron 1 mg/kg de cobre por 30 días consecutivos, ip), comparado con la LTP, obtenida de neuronas de CA1 en rebanadas procedentes de ratas controles que recibieron un ml de suero fisiológico ip por 30 días consecutivos. El gráfico muestra en el eje de las ordenadas el desempeño del PC llevado a porcentaje, el cual, promedia cinco rebanadas ($n = 5$), procedentes del grupo que recibió suero fisiológico, comparado en la misma variable que promedia diez rebanadas ($n = 10$), procedente del grupo que recibió cobre. En el eje de la abscisa (x) se muestra el tiempo (min x 10). Por cada rebanada tomamos 10 muestras en cada punto desde el min, -50, previo a la ET (min, 0) Tiempo control, y posterior a la ET, Tiempo LTP. Los trazos ubicados en la zona superior del gráfico señalan, Tiempo control (a). Tiempo ET (0). Tiempo LTP (b). Note que las respuestas de ambos grupos se mantienen estables y similares durante el período control. A partir del momento de la ET, las rebanadas sin cobre desarrollaron el fenómeno de LTP, por el contrario, el grupo de rebanadas que recibió cobre no desarrollaron LTP, curiosamente el tráfico sináptico fue mantenido.

Conclusión

Nuestros resultados parecen contradictorios, por una parte el cobre suprime la LTP en rebanadas de hipocampo, por otra parte, no altera la memoria ni el aprendizaje de las ratas. Relacionado con lo anterior, existen numerosas publicaciones que identifican altas concentraciones de cobre en patologías neurodegenerativas, como en

el Alzheimer¹⁷⁻²⁰. Contrariamente otros estudios no ven en el cobre un factor causal de esta enfermedad y el aumento del metal sería más bien una consecuencia derivada de la enfermedad²¹⁻²⁷. Nuestros resultados apuntarían que el aumento de cobre en el tejido nervioso puede cambiar ciertas respuestas electrofisiológicas experimentales, sin modificar las funciones de aprendizaje y memoria.

Resumen

El cobre es un elemento esencial en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Su acumulación excesiva en hígado, cerebro y particularmente en los ganglios basales, conduce al cuadro patológico conocido como la enfermedad de Wilson. Por otra parte, la ausencia de este metal en el recién nacido provoca degeneración cerebral y cerebelosa patología reconocida como enfermedad de Menkes. Actualmente se discute su papel en el Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica. Nuestros estudios en ratas han mostrado los efectos del cobre en la excitabilidad del hipocampo; su acción supresora de la LTP hipocámpica, sin alterar el aprendizaje y la memoria estudiados en el laberinto acuático de Morris, resultados paradójicos tanto desde la perspectiva neurofisiológica como en su inferencia clínica.

Palabras clave: Cobre, hipocampo, neurofisiología.

Referencias bibliográficas

- Cousins RJ. Metal elements and genes expresión. *Ann Rev Nutr* 1994; 14: 449-69.
- Linder MC, Hazegh-Azam. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 797 S-811 S.
- Waggoner DJ, Bartnikas TB, Gitlin JD. The role of copper in neurodegenerative disease. *Nurobiol Dis* 1999; 6: 221-30.
- Danks DM. Disorders of copper transport in: Sriver CR, Beaudet AL, Sly WM, Valle D. (Eds), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, Pp. 2211-2235. 7th ed., Mc. Graw-Hill, New York, 1995.
- Scheinberg IH, Sternlieb I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 842S-5S.
- Menkes JL, Alter GK, Steiggleder DR, Weakly JH, Sung A. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar air and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics* 1962; 29: 764-79.
- Revest P, Longstaff. *Molecular Neuroscience* Pp 151-90 Spring-Verlag, Inc., New York, 1998.
- Farrar JR, Hoss W. Effects of copper on the binding of agonists and antagonists muscarinic receptors in rat brain. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 2849-56
- Leiva J, Palestini M, Tetas M, López J. Copper sensitivity in dorsal hippocampus slices. *Arch Ital Biol* 2000; 138: 175-84.
- Collindridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol (London)* 1983; 334: 33-46.
- Kardos J, Kovacs I, Hajos F, Kalman M, Somoyi M. Nerve ending from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neural excitability. *Neurosci Lett* 1989; 103: 139-44.
- Shors TJ, Matzel LD. Long-term potentiation: what's learning to do with it? *Behav Brain Sci* 1997; 20: 597-655.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Neurociencia y conducta*. Cap. 36, Prentice Hall, Madrid, 1997, Pp. 730-8.
- Morris RGM. Development of water - maze procedure for studying spatial representation in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11: 47-60.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. Synaptic plasticity and memory. *Ann Rev Neurosci* 2000; 23: 649 -777.
- Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 2004; 84: 87-136.
- Bayer TA, Schäfer S, Simons A, Kemmling A, Kamer T, Tepest R, *et al.* Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 14187-92.

18. Brenner SR. Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer's disease 2006; 66: 294.
19. Bush AI. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trend Neurosci* 2003; 26: 207-14.
20. Squitti R, Lupo D, Pasqualetti P, *et al.* Elevation of serum copper in Alzheimer's disease. *Neurology* 2002; 59: 1153-61.
21. Leiva J, Gaete P, Palestini M. Copper interaction on the long-term potentiation. *Arch Ital Biol* 2003; 141: 149-55.
22. Morris RGM. Synaptic plasticity and memory. *Ann Rev Martin SJ, Grimwood PD, Neurosci* 2000; 23: 649-777.
23. Ageletti B, Waldron KJ, Freeman KB, Bawagan H, *et al.* BACE1 cytoplasmic domain interacts with the copper chaperone for superoxide dismutase-1 and binds copper. *J Biol Chem* 2005; 280: 17930-7.
24. Bellingham SA, Lahiri DK, Maloney B, LA Fontaine S, *et al.* Copper depletion down-regulates expression of the Alzheimer's disease amyloid beta precursor protein gene. *J Biol Chem* 2004; 279: 20378-86.
25. Goldschmith A, Infante C, Leiva J, Motles E, Palestini M. Interference of chronically ingested copper in long-term potentiation (LTP) of rat hippocampus. *Brain Res* 2005; 1056: 176-82.
26. Leiva J, Palestini M, Infante C, Goldschmidt A, Motles E. Copper suppresses hippocampus LTP in the rat, but does not alter learning or memory in the Morris water maze. *Brain Res* 2009; 1256: 69-75.
27. Ye L, Qi JS, Quiao JT. Long-term potentiation in hippocampus of rats is enhanced by endogenous acetylcholine in a way that is independent of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci Lett* 2001; 300: 145-48.

Correspondencia:

Juan Leiva R.

Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Avenida Salvador 486, Santiago, Providencia.

Fono: 2741560

E-mail: jleiva@med.uchile.cl