

01921  
2161



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

CANABINOIDES ENDÓGENOS MODULADORES DE  
LA MEMORIA ESPACIAL Y MEMORIA DE TRABAJO.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**  
P R E S E N T A :  
**PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO**

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR PROSPÉRA GARCÍA



**FACULTAD  
DE PSICOLOGÍA**

MEXICO, D. F.

2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México
- A mi familia
- A María Eugenia Mejía Bravo
- Al Dr. Oscar Próspero García
- A los mejores amigos que se puede tener : Británico González , Oswaldo Gutiérrez , Israel Orduña y Darío Torres
- A mis amigas: Liliana López y Corinne Montes
- Al grupo de Neurociencias de la Facultad de Medicina de la UNAM

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Capítulo 1. Memoria</b>	
1.1 Revisión histórica de memoria .....	3
1.1.1 Modelo de memoria de corto y largo plazo .....	4
1.1.2 Memoria declarativa y memoria no declarativa .....	6
1.2 Memoria espacial .....	7
1.2.1 Bases anatómicas de memoria espacial .....	8
1.2.2 Neuroquímica de la memoria .....	9
<b>Capítulo 2. Canabinoides</b>	
2.1 Canabinoides .....	13
2.2 Receptores a canabinoides .....	15
2.2.1 El receptor a canabinoides uno (CB1) .....	16
2.2.2 Distribución de los receptores a canabinoides .....	17
2.2.3 Variaciones diurnas.....	20
2.3 Canabinoides endógenos .....	20
2.3.1 Anandamida .....	21
2.3.2 Oleamida .....	24
2.4 El sistema canabinérgico y sus posibles funciones .....	25

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Capítulo 3. Planteamiento y desarrollo del problema**

3.1 Planteamiento del problema ..... 28

3.2 Método..... 29

    3.2.1 Sujetos ..... 29

    3.2.2 Aparatos ..... 29

    3.2.3 Fármacos ..... 30

    3.2.4 Procedimiento ..... 31

        3.2.4.1 Laberinto de Barnes ..... 30

        3.2.4.2 Administración ..... 35

    3.2.5 Análisis estadístico ..... 35

3.3 Resultados ..... 36

**Capítulo 4. Discusión y Conclusión**

4.1 Discusión ..... 50

    4.1.1 Grupos control ..... 50

    4.1.2 Anandamida ..... 51

    4.1.3 Oleamida ..... 53

    4.1.4 Combinación Anandamida-Oleamida ..... 55

    4.1.5 Memoria, endocannabinoides y variaciones diurnas ..... 56

4.2 Conclusión ..... 58

Referencias ..... 59

Anexo ..... 65

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Resumen

Recientemente se ha descrito la existencia de un sistema de transmisión inhibitorio conocido como "sistema canabinérgico". Este sistema tiene una amplia distribución en el sistema nervioso central y periférico, tanto los ligandos como los receptores. Se ha podido observar una alta expresión de receptores a canabinoides en el hipocampo, estructura relacionada con memoria. También se ha descrito la existencia de varias moléculas conocidas como endocannabinoides que se pegan a estos receptores. Dos de estas moléculas son la anandamida y la oleamida.

Por otro lado, se ha descrito que la expresión del receptor a canabinoides en el hipocampo varía a lo largo del ciclo luz-oscuridad presentando las mas altas concentraciones a las 13:00 hrs. y las mas bajas a la 1:00 hrs. La expresión diferencial de este receptor sugiere una modulación diferencial sobre la memoria dependiente del ciclo luz-oscuridad.

Esta evidencia sugiere que el sistema canabinérgico esta modulando el proceso de la memoria y que sus efectos son dependientes del ciclo luz-oscuridad. Los objetivos de este estudio fueron evaluar los efectos de la administración de anandamida, oleamida y la combinación de ambos sobre la ejecución en una prueba de memoria. Además, observar si estos efectos son dependientes del ciclo luz-oscuridad mediante la realización de los experimentos en los puntos donde la expresión de los receptores a canabinoides es mas alta (13:00 hrs.) y más baja (01:00 hrs.).

Los resultados describen diferencias en la forma de resolver el laberinto de Barnes dependiendo de la fase del ciclo luz-oscuridad en la que los sujetos fueron entrenados. Además, la administración de endocannabinoides modifica la elección de la estrategia para resolver el laberinto sin ocasionar déficit en los tiempos de ejecución o cantidad de errores. Estos datos muestran que el sistema canabinérgico participa en la elección de estrategias para resolver una tarea y que además este efecto es dependiente del ciclo luz oscuridad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Capítulo I**  
**Memoria**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.1 Revisión histórica de memoria espacial y memoria de trabajo

"Aprendizaje es el proceso mediante el cual se adquiere conocimiento acerca del mundo, mientras que memoria es el proceso mediante el cual ese conocimiento es codificado, almacenado y después es recuperado" (Kandel, 2000).

La anterior es una de las definiciones más sencillas de los complejos procesos de aprendizaje y memoria. Por supuesto el estudio de estos procesos no se reduce a unas cuantas líneas, y no bastaría una licenciatura para abordar todos los paradigmas y aproximaciones que se han empleado para llegar a esa sencilla definición.

Con respecto al estudio de la memoria, la principal pregunta siempre ha sido, ¿cómo funciona la memoria?, y se han utilizado diversas aproximaciones experimentales para contestar esta pregunta.

Estas aproximaciones se han encargado de averiguar si existe un solo tipo de memoria o si son varias; otros enfoques se ocupan de los correlatos anatómicos. Por otro lado, están aquellas que tratan de averiguar los correlatos fisiológicos que se encargan del proceso. Estos diversos enfoques no son excluyentes entre sí, de hecho el avance de uno es el avance del otro. La idea básica es que la memoria ha sido estudiada y puede estudiarse desde diferentes enfoques y que estos enfoques se complementan unos a otros.

De esta forma se han realizado modelos teóricos que predicen la forma en que la memoria funciona. Estos modelos toman en cuenta diferentes aspectos del proceso de memoria y son la base de los estudios experimentales. Para este trabajo nos basaremos principalmente en dos de estos modelos, uno que nos dice



por cuanto tiempo podemos mantener la información con nosotros, y otro que nos dice que tipo de información almacenamos.

#### 1.1.1 Modelo de memoria de corto plazo y largo plazo.

Este modelo se refiere a los tiempos en los que la información permanece disponible en el sistema. La mayoría de los autores coinciden en que la memoria de corto plazo tiene una capacidad limitada y requiere de un continuo repaso para no perderse y su duración es limitada (Kandel, 2000; Zigmond, 1999). La memoria de largo plazo es permanente, es más grande en capacidad y no requiere ensayo continuo.

A grandes rasgos, el modelo nos dice que si cierta información llega a nuestro sistema, inmediatamente se activa el mecanismo de memoria de corto plazo, si esta información se repite, puede llegar al almacén de memoria de largo plazo.

En psicología el estudio de la memoria ha sido siempre un tema de gran interés. Uno de los pioneros de este tipo de estudios fue Ebbinghaus quien trabajó en el descubrimiento de los límites de capacidad y duración de la memoria. Sus estudios con sílabas sin sentido, fueron una base importante de los estudios de memoria de corto y largo plazo.

Posteriormente, los estudios de memoria fueron retomados principalmente por teóricos de la conducta. De esta corriente proviene el modelo teórico de memoria de corto y largo plazo. Aquí se deriva el modelo que contempla dentro de la memoria de corto plazo al bucle fonológico, que se refiere al sustrato para mantener información de tipo verbal, la agenda viso espacial, para mantener información de tipo visual y el ejecutor central que se propone como el sustrato que mantiene la atención en cierto tipo de información (Badeley, 1999).

En la psicología moderna, el estudio de la memoria no se limita únicamente a la conducta, también se extiende a las bases fisiológicas de la misma. Durante algún tiempo, causó polémica la proposición de bases fisiológicas de la memoria, es decir, la proposición de áreas cerebrales específicas de la memoria. Sin embargo, las posturas comenzaron a suavizarse gracias a la aparición del paciente H.M. (Anexo 1), que es un caso dramático de déficit de memoria y marcó un parte aguas en el estudio de la memoria, dado que fue una de las pruebas más contundentes de que los modelos teóricos tenían una base fisiológica.

Uno de los campos del estudio de la memoria a los que el caso H.M. más aportó, fue precisamente al modelo de memoria de corto plazo y largo plazo. Como puede verse en el anexo 1, este paciente era capaz de mantener la información por periodos cortos de tiempo, es decir, no mostraba problemas con respecto a la memoria de corto plazo. Sin embargo, H.M. era incapaz de crear recuerdos duraderos de tipos de información específica, es decir, esa información que mantenía con relativa facilidad en el almacén de corto plazo no podía llegar al almacén de memoria de largo plazo.

Posterior a la aparición del caso H.M. diversos estudios a nivel fisiológico fueron realizados tomando como modelo a este paciente. Los científicos comenzaron a trabajar en la realización de modelos animales similares a H.M. y gracias a ellos se llegó a sugerir que la memoria de corto plazo requiere de activación sináptica; es decir, que el estímulo se presente y que el organismo lo detecte a nivel celular (Kandel, 2000). Por otro lado, la memoria de largo plazo requiere de tres pasos que aparentemente son consecutivos, estos son, activación sináptica, activación de genes y síntesis de nuevas proteínas (Kandel, 2000).

Algunos autores coinciden en que la duración de la memoria de corto plazo corresponde a la duración de los primeros cambios sinápticos, y algunos dicen que estos cambios van de minutos a algunas horas, mientras que la memoria de largo plazo es de duración ilimitada (Kandel, 2001).

Ligado a los conceptos de memoria de corto plazo y largo plazo se encuentran otros conceptos que han sido fundamentales a través del estudio de la memoria, estos son: la codificación, la consolidación y la recuperación. Este tipo de conceptos fue creado con el fin de facilitar el estudio de la memoria y se refiere a lo que se supone el organismo realiza con la información que lo estimula.

La integridad de estas tres fases es el sustento de la memoria de largo plazo. Los científicos coinciden en que en un experimento de memoria, estas tres fases pueden ser manipuladas experimentalmente, las consecuencias de esta manipulación se verán reflejadas en la fase de recuperación.

En el presente estudio se toma como pilar importante el modelo de memoria de corto y de largo plazo, y se toma en cuenta los tiempos en los cuales estos tipos de memoria son mas propensos a ser modificados. Como se verá mas adelante, este experimento busca afectar la fase de consolidación de memoria sin afectar la fase de adquisición.

### 1.1.2 Memoria declarativa y memoria no declarativa.

Para fines de estudio, la memoria se ha dividido en memoria declarativa (explícita) y memoria no declarativa (implícita) (Sigmond, 1999; Kandel, 2000). La memoria declarativa se refiere a los recuerdos de hechos o eventos, lugares, cosas y lo que estos hechos significan. Además este tipo de memoria puede ser recuperada por un esfuerzo consciente y deliberado. Esta se ha asociado con el lóbulo temporal medial (Kandel, 2000). Por otro lado, la memoria de tipo implícita se refiere a la información de como ejecutar una actividad, habilidades y conducta, esta es una memoria que es recuperada de manera inconsciente. Se ha asociado con la neocorteza, el núcleo estriado, la amígdala y el cerebelo (Kandel, 2000).

La aparición del paciente H.M. además de enriquecer el campo de las neurociencias en el área de la memoria de corto y largo plazo, también aportó información contundente de las divisiones anatómicas y funcionales de la memoria. El déficit de este sujeto no solo mostraba su incapacidad de acceder al almacén de largo plazo, sino que mostraba una especificidad en la información que no podía ser almacenada.

Las características de H.M. mostraban que su padecimiento era más que un padecimiento de memoria general, un padecimiento de memoria de tipo declarativa. El paciente H.M. es uno de los casos más útiles y reveladores para los estudiosos de la memoria dado que es una de las más contundentes evidencias de que el modelo de memoria explícita e implícita es verdadero, además de proveer información de los centros anatómicos involucrados en el proceso mnémico.

## 1.2 Memoria espacial

Los procesos fisiológicos que abarca la clasificación de memoria declarativa incluye un tipo específico de memoria que es fundamental en el presente estudio, la memoria espacial.

La memoria espacial se refiere a la capacidad de recuperar información para orientarse a través de claves visuales. Los modelos comúnmente utilizados para estudiar este tipo de memoria han sido laberintos de distintos tipos y formas. Su estudio ha sido abordado desde enfoques meramente conductuales hasta enfoques fisiológicos, electrofisiológicos, genéticos, moleculares, etc.

Uno de los primeros investigadores de memoria espacial fue Karl Lashley en la década de los 20's. Este investigador estaba interesado en describir los efectos de

lesiones cerebrales en el aprendizaje de ratas. Sus experimentos fueron realizados en laberintos que debían resolverse para obtener reforzadores. Lashley realizaba grandes extirpaciones de la corteza cerebral de ratas y después probaba a los sujetos en sus laberintos, con objeto de encontrar posibles estructuras relacionadas con los procesos de memoria. Algunas de sus conclusiones fueron que entre más grande fuera la zona de corteza cerebral extirpada más grande era el déficit. Sus experimentos fueron algunos de los primeros modelos animales en encargarse de la memoria espacial y de sus correlatos anatómicos. Sin embargo, las tendencias científicas fueron inclinándose por modelos de ablación más específicos.

Los estudios posteriores concentraron su atención en los lóbulos temporales, y después de la publicación del caso del paciente H.M. pocos eran los que ponían en duda la participación de estos lóbulos en el proceso de memoria y en especial memoria declarativa. Conforme las lesiones fueron haciéndose más específicas fue haciéndose patente que el hipocampo era una estructura fundamental en los procesos de memoria, y se le relacionó importantemente con el establecimiento de memoria espacial.

### 1.2.1 Bases anatómicas de memoria espacial

Desde los estudios de Lashley podía vislumbrarse que las estructuras que podían estar correlacionadas con la memoria declarativa incluyendo la memoria espacial deberían estar en los lóbulos temporales. El ya mencionado caso H.M. también fue otra de las evidencias que mostraban la participación de estas estructuras. Después, con la aparición de modelos más específicos y el empleo de laberintos, el hipocampo comenzó a vislumbrarse como una estructura fundamental de la memoria. Pronto, más experimentos mostraron que la ausencia o el bloqueo farmacológico de esta estructura eran suficientes para causar disfunciones en memoria declarativa y muy importantemente en memoria espacial.

A los estudios de laberintos y ablaciones de tejido cerebral se unieron estudios electrofisiológicos que buscaban establecer claramente la participación hipocampal. De estos estudios en registro unitario celular surge una de las evidencias más importantes de la participación del hipocampo en memoria espacial, que fue el descubrimiento de las células de lugar por O'Keefe en la década de los 70's (revisado en Chan-Palay y Christer, 1989). En estos trabajos se propone que las células hipocampales son los elementos funcionales en un sistema que representa las claves espaciales de un ambiente o un contexto espacial. Es decir, las células hipocampales disparan cuando el animal está en lugares particulares de un ambiente (revisado en Chan-Palay y Christer, 1989).

Las evidencias reportadas en la literatura señalan definitivamente al hipocampo como la estructura fundamental de la memoria declarativa y en especial la memoria espacial. De esta forma, si se busca un correlato anatómico responsable de la memoria espacial el hipocampo es el que debe ser responsabilizado. Sin embargo, los estudios sobre memoria espacial no se limitan al descubrimiento de los correlatos anatómicos o del funcionamiento de las células del hipocampo, también han centrado su atención en los neurotransmisores que puedan estar implicados en el proceso de memoria.

### 1.2.2 Neuroquímica de la memoria

Como ya se ha mencionado, el hipocampo es la estructura cerebral relacionada con memoria espacial, es por eso que no suena extraño que los neurotransmisores implicados en la memoria son los que afectan el hipocampo. Los neurotransmisores comúnmente involucrados con los procesos de memoria son glutamato y acetilcolina; sin embargo, otras sustancias de distinta naturaleza bioquímica han sido relacionadas también, por ejemplo péptidos como cortistatina (Sánchez-Alavez y cols, 2000).

El hipocampo tiene especialmente células glutamatérgicas. Existe gran cantidad de estudios que muestran que la ausencia de glutamato afecta los procesos mnémicos. El glutamato es el neurotransmisor que modula la mayoría de las sinapsis excitatorias en el sistema nervioso central de los mamíferos. Además, este neurotransmisor participa en los cambios sinápticos que subyacen a la memoria (Ozawa y cols, 1998). Se ha descrito que la administración exógena de este neurotransmisor, o de agonistas a este neurotransmisor facilita la memoria en tareas espaciales (Mason y cols, 1999).

Una vez que se demostró conductualmente que el glutamato es importante para la memoria, estudios a nivel electrofisiológico han demostrado que el glutamato es necesario para el establecimiento de la potenciación a largo plazo (LTP). La LTP es un modelo electrofisiológico que se propone como el correlato anatómico funcional de la memoria (Bennett, 1999). La literatura muestra que el glutamato es el principal neurotransmisor para el establecimiento de la memoria, esto no significa que sea el único, pero tal vez sí el más importante.

Además del glutamato, otro neurotransmisor que se ha relacionado importantemente con la memoria es la acetilcolina. Se ha demostrado que el hipocampo recibe una importante inervación colinérgica. Además se ha demostrado que en el hipocampo también existen células colinérgicas además de las células piramidales glutamatérgicas antes mencionadas (revisado en Chan-Palay y Christer, 1989).

Estudios a nivel conductual y electrofisiológico han hecho patente la participación de la acetilcolina en el establecimiento de la memoria. Se ha reportado que un déficit en el sistema colinérgico afecta el establecimiento de la memoria de tipo declarativa (Perry y cols, 1999). Por otro lado, se ha reportado que la administración de agonistas colinérgicos mejora la ejecución de diferentes tipos de tareas de memoria espacial (Hodges y cols, 1999; Ruscke y cols, 1999). En estudios a nivel electrofisiológico se ha reportado que agonistas colinérgicos

facilitan la LTP (Ye y cols, 2001) que como ya se había mencionado es un modelo electrofisiológico propuesto para el establecimiento de la memoria de largo plazo.

La memoria ha sido relacionada importantemente con los neurotransmisores acetilcolina y glutamato; sin embargo, no son las únicas moléculas relacionadas con este proceso. El hipocampo además de ser glutamatérgico y recibir información colinérgica, también recibe información GABAérgica, serotoninérgica, y noradrenérgica (Bici y Kiss, 1998).

Otro tipo de sustancias que podrían estar implicadas en el proceso de memoria son los denominados cannabinoides endógenos. Los receptores a estas moléculas se encuentran altamente distribuidos en el sistema nervioso periférico y en el sistema nervioso central. En este último se encuentran altamente distribuidos en la formación hipocampal (Glas y cols, 1997; Tsuo y cols, 1998), por lo que su participación en memoria de tipo espacial parece factible. Los cannabinoides endógenos son parte fundamental en este trabajo y se retoman en el siguiente capítulo.



## **Capítulo II**

### **Canabinoides**

## 2.1 Canabinoides

Cannabis Sativa es el nombre científico de la marihuana. En la actualidad la marihuana es sin duda uno de los fármacos de abuso de mayor consumo a nivel mundial. Las estadísticas al respecto son contundentes. En Estados Unidos, por ejemplo, el 50 % de la población entre los 12 y 18 años ha probado por lo menos una vez en su vida la marihuana. En nuestro país, su uso con fines terapéuticos es tema de legalización en el Congreso de la Unión. En otros países como Holanda o Canadá su uso con fines terapéuticos ya está permitido. Quizás uno de los mayores problemas para su legalización sea precisamente sus propiedades adictivas.

La marihuana ha sido utilizada con fines terapéuticos, religiosos y recreacionales. Se emplea con fines terapéuticos como antiemético o analgésico. También se emplea para controlar la presión arterial (Ameri, 1999). Por estas características es utilizada como tratamiento para disminuir los malestares de la quimioterapia en pacientes con cáncer y también se utiliza como estimulante de apetito en pacientes con SIDA.

Las propiedades adictivas y terapéuticas de este polémico fármaco le han bastado para obtener fama. Los científicos comenzaron a interesarse en este compuesto y así se descubrieron sus principales componentes activos. La marihuana contiene cerca de 60 componentes activos que son llamados canabinoides.

El principal componente activo de la marihuana es el  $\Delta 9$ -Tetrahidrocanabinol ( $\Delta 9$ -THC), que fue descrito en 1964 por Gaoni y Mechoulam (revisado en Ameri, 1999). Las características lipofílicas de este compuesto le permiten cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica. Además del  $\Delta 9$ -THC, otros compuestos menos potentes fueron descritos también. Por ejemplo, el  $\Delta 8$ -Tetrahidrocanabinol.

Cuando se administra marihuana el  $\Delta 9$ -THC se transforma en el metabolito 11-hidroxi- $\Delta 9$ -THC, este metabolito es aun mas potente que el mismo  $\Delta 9$ -THC y atraviesa mas fácilmente la barrera hematoencefálica. Después, este metabolito es transformado por el hígado en otros metabolitos inactivos, entre los que se encuentra el 11-nor-carboxi- $\Delta 9$ -THC que es el metabolito mas abundante en plasma sanguíneo y orina y es el que se puede detectar hasta tres o cuatro días después de haber fumado un solo cigarro de marihuana (Ameri, 1999).

Los efectos de los cannabinoides pueden contarse a diferentes niveles, por ejemplo, los efectos a nivel del sistema inmunológico, a nivel del hígado y el sistema reproductivo y a nivel cognoscitivo y conductual. Para los efectos de este trabajo nos interesan principalmente los efectos a nivel psicofarmacológico y conductual.

Los efectos de los cannabinoides a nivel conductual pueden variar con respecto a la dosis, la vía de administración, las expectativas de los sujetos y la vulnerabilidad de los sujetos hacia el fármaco (Ameri, 1999). A pesar de estos factores, se ha mostrado que los cannabinoides producen generalmente un único síndrome caracterizado por un periodo inicial de euforia y relajación seguido por un periodo de depresión. Por otro lado, se ha reportado que la administración de cannabinoides produce un cuadro característico conformado por hipomotilidad, analgesia y disminución de la temperatura corporal.

La exposición a cannabinoides también va acompañada por una alteración de algunos procesos cognoscitivos, como alteración en la percepción del tiempo, incremento de los tiempos de reacción y un decremento en la coordinación motora, atención y disfunciones en tareas de memoria (Ameri, 1999).

Con respecto a memoria, se ha reportado que la administración de  $\Delta 9$ -THC ocasiona déficits en la adquisición de una tarea de memoria espacial (Litchman y Martin, 1996). Además, estudios a nivel electrofisiológico muestran que los

canabinoides disminuyen la liberación de neurotransmisores importantes para la memoria como el glutamato y la acetilcolina en regiones hipocampales (Gessa y cols, 1997; Gessa y cols, 1998; Sullivan, 1999).

Una vez que los efectos canabinérgicos comenzaron a caracterizarse científicamente, los investigadores comenzaron a buscar los receptores en el organismo con los que pudieran estar interactuando, así se descubrieron los receptores a canabinoides. Este tipo de receptores ha sido descrito como aquel con el que los canabinoides interactúan primordialmente para causar sus efectos (Ameri, 1999), y son tema del siguiente apartado.

## 2.2 Receptores a canabinoides

El mecanismo de acción de los canabinoides comenzó a ser materia de discusión, y las especulaciones acerca de su funcionamiento apuntaban hacia una interacción directa con la membrana celular dadas las propiedades lipofílicas de los canabinoides. Sin embargo para 1984 los investigadores Howlet y Fleming observaron que la administración directa de canabinoides en células de neuroblastoma inhibía sistemáticamente la adenilato ciclasa (revisado en Ameri, 1999), lo que sugería la participación de una proteína G inhibitoria, lo que a su vez sugería la participación de un receptor específico. Aunados a esta evidencia, los estudios de Devane y colaboradores (1988) mostraron que los principales efectos a nivel central de los canabinoides estaban mediados por la interacción con una proteína específica de la membrana, el receptor a canabinoides uno (CB1).

Hasta el momento dos han sido los receptores a canabinoides más estudiados el CB1 y el CB2. Su distribución en el organismo ya ha sido descrita y se sabe que el CB1 se encuentra principalmente a nivel del sistema nervioso central, mientras que el CB2 se encuentra distribuido principalmente en células del

sistema inmune y del sistema nervioso periférico (revisado en Ameri, 1999). Este tipo de distribución hace a los receptores CB1 más interesantes para este trabajo.

### 2.2.1 El receptor a cannabinoides uno (CB1)

El receptor a cannabinoides fue descrito en 1990 por Matsuda y colaboradores (revisado en Ameri, 1999), se encuentra codificado en el cromosoma 6 del humano. En ratones el CB1 está localizado en el cromosoma 4 (revisado en Ameri, 1999). El CB1 es un receptor metabotrópico de siete dominios transmembranales que está acoplado a una proteína G inhibitoria (revisado en Ameri, 1999).

Estudios sobre la distribución del CB1 han sido realizados en rata y humano. Se ha logrado distinguir que el CB1 está principalmente distribuido en el sistema nervioso central donde las principales concentraciones están en hipocampo y sustancia negra (Glass y cols, 1997; Tsou y cols, 1998). Esta distribución en el cerebro y específicamente su distribución en hipocampo hacen pensar que este tipo de receptores están implicados en el funcionamiento hipocampal.

El receptor CB1 está ligado a diferentes vías de transducción de señales, entre las que se encuentran la adenilato ciclasa, la MAP cinasa y canales iónicos. Con respecto a la adenilato ciclasa, se ha descrito que los cannabinoides son capaces de inhibirla en forma reversible dependiente de la dosis. Este es el principal descubrimiento que liga los efectos del CB1 a una proteína G inhibitoria (revisado en Ameri, 1999) y esta es la razón de la disminución en la producción de AMP cíclico después de la administración de cannabinoides. Un dato que debe tomarse en cuenta es que los receptores a cannabinoides parecen estar colocalizados con otros receptores acoplados a proteínas G en una misma neurona (revisado en Ameri, 1999). Este tipo de asociación podría ser la base de un mecanismo modulador canabinérgico en otros sistemas de neurotransmisión, como las células

piramidales glutamatérgicas del hipocampo, en donde como veremos adelante, los receptores a canabinoides están altamente expresados (Glass y cols, 1997; Tsou y cols, 1998).

Además de ejercer un efecto en la adenilato ciclasa y la producción de AMPc, también se ha reportado que el CB1 tiene un efecto modulador en canales iónicos. Se ha reportado que el CB1 modula la actividad de canales voltaje-dependientes de calcio específicamente del tipo N y P/Q, y que aumenta la activación de canales voltaje-dependientes de potasio, específicamente los del tipo A (Ameri, 1998). Este tipo de canales de calcio están localizados en la presinapsis y están implicados en liberación de neurotransmisores. Es por eso que se propone que los receptores a canabinoides están implicados en la modulación de la liberación del neurotransmisor. Gessa y colaboradores (1998) demostraron que la liberación de acetilcolina disminuye por efecto de los canabinoides, y que este efecto es bloqueado por la administración del antagonista al receptor a canabinoides SR141716A. Adicionalmente, otros estudios muestran que la liberación de glutamato en células hipocámpales también disminuye por efecto canabinérgico (Sullivan, 1999).

El papel de los receptores a canabinoides en el cerebro todavía no está claro, sin embargo, la literatura citada muestra una posible ingerencia de este sistema en la modulación de la liberación de neurotransmisores como acetilcolina y glutamato, que además son neurotransmisores altamente involucrados en el proceso de memoria, lo que sugiere una posible participación del sistema canabinérgico en el proceso de memoria.

### 2.2.2 Distribución de los receptores a canabinoides

Otro tipo de evidencia que sugiere la participación del sistema canabinérgico en el proceso de memoria es la distribución anatómica de sus receptores en el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cerebro. Algunos de los trabajos que se han hecho al respecto muestran una altísima densidad de receptores CB1 en el hipocampo, de hecho se reporta como la expresión mas alta en cerebro de rata y de humano (Glass y cols,1997; Tsou y cols, 1998; Pettit y cols, 1998; Ong y Mackie, 1999; Bisognio y cols, 1999; Egertova y Elphick, 2000). Para este trabajo es importante la distribución del CB1 en el cerebro de rata, por lo que a continuación se ilustra y se detalla.

Los estudios de distribución de CB1 se han hecho principalmente a través de técnicas de inmunohistoquímica, autoradiografía e hibridación *in situ* (Glass y cols,1997; Tsou y cols, 1998; Pettit y cols, 1998; Ong y Mackie, 1999; Bisognio y cols, 1999; Egertova y Elphick, 2000). Los resultados son similares con las distintas técnicas y muestran una alta distribución en todo el cerebro de rata y de humano. En particular hay una alta distribución de CB1 en corteza somatosensorial principalmente en las capas superficiales 2 y 3 y en la capa profunda 4 (Tsou y cols, 1998). La corteza del cíngulo presenta una distribución moderada.

Tsou y colaboradores (1998) reportan una alta concentración de receptores a canabinoides en la formación hipocampal, distinguiéndose los grupos neuronales piramidales de CA1 y CA3, las intensidades observadas en hipocampo fueron las más altas en todo el cerebro (Ilustración 1)

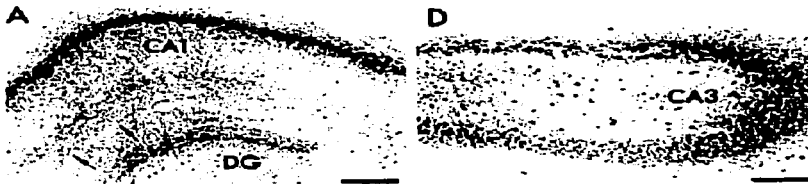


Ilustración 1 Muestra la expresión de receptores CB1 en CA1(A) y CA3(D) hipocampal (Tsou y cols, 1998)

Otra región que muestra una importante cantidad de receptores a cannabinoides fue el complejo amigdalino. Aquí se encontraron altas concentraciones en el núcleo central, el núcleo basolateral y en el núcleo cortical anterior.

Los núcleos de la base presentan también una importante cantidad de receptores a cannabinoides. Aquí se distinguen el núcleo caudado, el putamen y la sustancia negra. El cerebelo también muestra una importante distribución del CB1, especialmente en las capas moleculares de la corteza cerebelosa.

Además del trabajo de Tsuo se han realizado otros, por ejemplo el de Glass y cols, 1998 que fue realizado en el cerebro de humanos y que muestra prácticamente las mismas tendencias en la distribución del CB1, haciendo énfasis en la importante expresión en el hipocampo. Otro trabajo con inmunohistoquímica es el de Pettit y cols (1998), quienes reportan datos muy similares a los anteriores y muestran una alta distribución en el hipocampo, los núcleos basales y el cerebelo. De este trabajo se toma una ilustración que muestra de manera general la distribución de los cannabinoides en el cerebro de rata (Ilustración 2). Las partes más oscuras representan la mayor concentración del receptor.



Ilustración 2. Muestra la distribución en el cerebro de rata del receptor a cannabinoides I (CB1). (Pettit y cols, 1998)



Como puede observarse, la alta distribución del CB1 en el hipocampo es otra evidencia fuerte de la posible participación del sistema canabinérgico en el proceso de memoria.

### 2.2.3 Variaciones diurnas

Una característica que se ha observado en la administración de cannabinoides es que parecen alterar los ritmos circadianos. Por ejemplo, se ha reportado que la administración de  $\Delta 9$ -THC interfiere con la normalidad de estos ritmos (Perron y cols, 2001). Adicionalmente, se ha reportado que el receptor a cannabinoides varía su expresión a lo largo del ciclo luz oscuridad (Martínez-Vargas y cols, 2002 en prensa). Este trabajo fue realizado en tejido de puente y de hipocampo de ratas privadas y no privadas de sueño. Los resultados mostraron que las concentraciones normales del CB1 varían a lo largo del ciclo luz oscuridad presentando altos niveles a las 13:00 hrs. y bajos niveles a la 1:00 hrs. tanto en el puente como en el hipocampo.

La expresión diferencial de los receptores CB1 a través del día, hace pensar en que la función en la que estos receptores estén implicados puede variar también a lo largo del ciclo luz oscuridad.

## 2.3 Canabinoides endógenos

Después del descubrimiento de los receptores a cannabinoides los investigadores se dieron a la tarea de encontrar las moléculas que pudieran interactuar con este receptor y que además estuvieran naturalmente en los organismos. Moléculas que pudieran imitar los efectos del  $\Delta 9$ -THC o algún otro canabinoide previamente descrito. Los estudios se realizaron principalmente

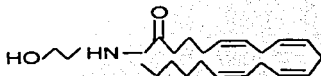
aislando moléculas de distintos tejidos de distintos animales, y así se descubrieron los ahora denominados canabinoides endógenos o endocannabinoides, entre los que se encuentra anandamida que es el canabinoide endógeno principalmente descrito, oleamida y 2AG, entre otros. Este apartado está dedicado a las principales características de los dos cannabinoides endógenos que se utilizaron en este estudio, anandamida y oleamida.

### 2.3.1 Anandamida

A principios de la década de los 90s un grupo israelí descubrió la primera molécula endógena capaz de unirse al receptor CB1, esta molécula fue aislada de extractos cerebrales porcinos, y fue llamada *Arachidonylethanolamide* (*anandamide*); en español *anandamida* (ANA) (Devane y cols, 1992). Su nombre proviene del sánscrito de la palabra *ananda* que significa, "la que brinda tranquilidad" y de *amida* por su terminación química (revisado en Ameri, 1999).

ANA es un lípido, tiene una vía de síntesis y una vía de degradación. Con respecto a la vía de síntesis, se cree que este endocanabinoide puede ser almacenado en la membrana lipídica de las células en la forma de N-araquidonilfosfatidiletanolamina, después, se convierte en anandamida (Ameri, 1999). Se ha propuesto que la formación de N-araquidonilfosfatidiletanolamina ocurre a través de diferentes eventos enzimáticos que afectan a diferentes componentes lipídicos de la membrana. Cadas y colaboradores (1997) proponen que la activación del N-araquidonilfosfatidiletanolamina ocurre por un aumento en la concentración intracelular de calcio por efecto de la actividad neuronal. La formación de esta molécula ocurre a partir de ácido araquidónico. El ácido araquidónico se transforma a través de la acción de una enzima catalizadora (N-acetiltransferasa) y un donador de lípidos (sn-1-araquidonil fosfolípido) en fosfatidiletanolamina. Una vez que el ácido araquidónico se transforma en fosfatidiletanolamina se forma el enlace amida, que da lugar a la molécula

precursora de anandamida, el N-araquidonilfosfatidiletanolamina. Después, por acción de una fosfolipasa D, esta molécula se transforma en anandamida. De esta forma, se propone que anandamida se almacena en la membrana celular en la forma de su precursor antes mencionado.



### Anandamide

Ilustración 3 Muestra la estructura química de Anandamida

Con respecto a la inactivación de anandamida se proponen dos posibles vías, la recaptura y la degradación enzimática (revisado en Ameri A., 1999). Duch y Chin (1993) han demostrado que anandamida es rápidamente recapturada por células de neuroblastoma y es degradada en ácido araquidónico y etanolamina por una amidasa. Cravatt y colaboradores (1996) descubrieron que anandamida era degradada por una enzima llamada amino-hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH).

La distribución de anandamida en el cerebro de rata y humano fue caracterizada por Felder y colaboradores (1996), encontraron que las mas altas concentraciones de anandamida se encuentran en hipocampo, tanto en rata como en humano.

El descubrimiento de una molécula endógena capaz de unirse al receptor a canabinoides que como ya se ha visto, se encuentra altamente distribuido en el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cerebro motivó a los investigadores a encontrar sus posibles funciones en el organismo.

Los primeros esfuerzos fueron realizados investigando los efectos biológicos. Anandamida produce efectos farmacológicos similares a los de los agonistas cannabinérgicos clásicos como el  $\Delta 9$ -THC, es decir analgesia, hipotermia e hipomotilidad (revisado en Ameri, 1999).

Anandamida ha sido reportada como inductora de sueño, su administración intracerebroventricular disminuye la vigilia, aumenta el sueño de ondas lentas 2 y sueño de movimientos oculares rápidos en rata (Murillo-Rodríguez y cols, 1998). También se ha propuesto a anandamida como moduladora de la ingesta de alimento (Hao y cols, 2000)

Algunos estudios a nivel electrofisiológico muestran que la administración de anandamida interfiere con la liberación de acetilcolina y glutamato (Gessa y cols, 1998; Sullivan, 2000). Por otro lado, se ha reportado que la administración de anandamida altera las concentraciones de neurotransmisores como dopamina, norepinefrina y serotonina en el hipocampo y el hipotálamo (Hao y cols, 2000). También interfiere con las propiedades de pegado de receptores colinérgicos (Cristopoulos y Wilson, 2001).

Algunos investigadores han tratado de establecer una relación con la memoria, por ejemplo, se ha observado que anandamida interfiere con una tarea de prevención pasiva (Murillo-Rodríguez y cols, 1998).

La alta distribución de anandamida en hipocampo, además de las evidencias mencionadas sugiere que este endocanabinoide tiene una función en la memoria, sin embargo, ninguno de los datos actuales es lo suficientemente claro como para dar una conclusión contundente de su papel en la formación de la memoria.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 2.3.2 Oleamida

Anandamida fue el primer canabinoide endógeno descrito, después se descubrieron otras moléculas similares, una de ellas fue oleamida, otro lípido con características similares a anandamida.

En 1995 se reporta la caracterización química de un lípido aislado del líquido cefalorraquídeo de gatos privados de sueño que era capaz de inducir sueño, el *cis-9,10-octadecenoamide* (Cravatt y cols, 1995) u *oleamide*, en español *oleamida*.



Ilustración 4 Muestra la conformación química del *cis-9,10-octadecenoamide* (Oleamida)

Se ha demostrado que oleamida es sintetizado a partir de ácido oleico y amonio, y al parecer la amida hidrolasa de los ácidos grasos (FAAH) es la encargada de su degradación (revisado en Cheer y cols, 1999).

Oleamida ha sido propuesta como canabinoide endógeno dado que tiene características estructurales semejantes a anandamida y comparte la vía de degradación. Aunado a esto, se ha demostrado que oleamida también es capaz de unirse al receptor CB1 (Cheer y cols, 1999). Por esto, oleamida se ha propuesto como un canabinoide endógeno más.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los efectos de oleamida son similares a aquellos producidos por la administración de un canabinoide como  $\Delta 9$ -THC. Por ejemplo, se ha podido observar que este fármaco disminuye la motilidad en ratas (Cheer y cols, 1999). Además produce analgesia y disminuye la temperatura en ratas (Murillo-Rodríguez y cols, 2001). Este tipo de efectos fortalece la hipótesis de que oleamida forma parte del sistema canabinérgico.

Los efectos en memoria de este canabinoide no son claros, se reporta que la administración de oleamida afecta una tarea de prevención pasiva (Murillo-Rodríguez y cols, 2001). Sin embargo el papel que pudiera tener este canabinoide endógeno en la formación de memoria espacial no es claro. Además, la alta presencia del receptor CB1 en hipocampo y el hecho de que oleamida se pega a este receptor sugieren su participación en memoria espacial. Por otro lado, y como ya se había mencionado, la existencia de un sistema canabinérgico al que oleamida pertenece y este sistema parece estar ligado a la modulación de memoria.

#### 2.4 El sistema canabinérgico y sus posibles funciones

La alta presencia de receptores a cannabinoides en el sistema nervioso central y la existencia de moléculas endógenas afines a estos receptores son evidencia que sustenta la existencia de un sistema de transmisión canabinérgico. Las posibles funciones de este sistema han empezado a caracterizarse y se le propone básicamente como un sistema modulador de actividad sináptica (Ameri, 1998). Se ha podido observar que la administración de cannabinoides endógenos interfiere con la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, glutamato, serotonina y norepinefrina (Gessa y cols, 1998; Cheer y cols, 1999; Sullivan, 1999; Hao y cols, 2000). También se ha reportado que la administración de cannabinoides endógenos interfiere con procesos electrofisiológicos como LTP (Sullivan, 1999; Sullivan, 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fisiológicamente, ha podido observarse que la estimulación de este sistema tiene resultados muy similares a los efectos por administración de cannabinoides como el  $\Delta^9$ -THC. Por ejemplo, hipomotilidad, analgesia, disminución de la temperatura corporal y déficit cognitivo. Los efectos de los cannabinoides endógenos sobre la cognición son los que interesan a este trabajo, especialmente memoria espacial.

Los trabajos sobre memoria y cannabinoides existentes señalan que la estimulación de los receptores a cannabinoides tiene como resultado un déficit en el proceso de memoria (Ameri, 1998; Hao y cols, 2000). Sin embargo, no parece normal que un organismo mantenga consigo un sistema de neurotransmisión que lo ponga en desventaja ante un medio exigente en el que no parece haber cabida para déficit alguno. Los efectos en la liberación de neurotransmisores perfilan al sistema canabinérgico como un sistema modulador mas que como un sistema que ocasione déficits. De esta forma, se propone al sistema canabinérgico como un sistema modulador para el establecimiento de la memoria.

Los datos obtenidos a partir del descubrimiento de las moléculas endógenas capaces de pegarse al receptor a cannabinoides son de gran utilidad dado que la molécula con la que se trabaja no es una molécula extraña al cuerpo. Los cannabinoides endógenos representan un poco mas la normalidad con la que el sistema funciona, la alteración de las concentraciones naturales de estas sustancias naturales puede aportar datos mas apegados a la realidad de la función del sistema canabinérgico y del proceso de memoria en general.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Capítulo III**  
**Planteamiento y desarrollo del problema**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 3.1 Planteamiento del problema

La alta distribución de CB1 en el hipocampo, el efecto de los cannabinoides en la liberación de neurotransmisores como glutamato, GABA y acetilcolina, además de sus efectos en LTP, son antecedentes que sugieren al sistema canabínérgico como modulador del proceso de memoria.

Otro punto importante es que los receptores a cannabinoides presentan una expresión diferencial (altos niveles 13:00hrs., bajos niveles 1:00 hrs.) a lo largo del ciclo luz oscuridad (Martínez-Vargas y cols, 2001), es por eso que parece viable que los efectos canabínérgicos en memoria puedan también variar a lo largo del ciclo luz oscuridad.

De esta forma, se espera que la interacción de los cannabinoides endógenos con neurotransmisores implicados en el proceso de memoria influyan en la consolidación de la memoria de manera diferencial dependiendo del ciclo luz oscuridad. Las hipótesis son las siguientes:

- Los cannabinoides endógenos *anandamida* y *oleamida* alteran la ejecución en el laberinto de Barnes.
- Los efectos de los endocannabinoides sobre la memoria espacial varían a lo largo del ciclo luz-oscuridad.

Para probar las hipótesis anteriores se plantearon los siguientes objetivos:

- Inducir un incremento en los niveles de cannabinoides endógenos mediante la administración intraperitoneal de anandamida, oleamida o la combinación anandamida-oleamida y evaluar sus efectos en la ejecución en el laberinto de Barnes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Observar si los efectos de los cannabinoides son dependientes del ciclo luz oscuridad mediante la realización de los experimentos a las 13:00 hrs. y 1:00 hrs.

### 3.2 Método

#### 3.2.1 *Sujetos:*

Se emplearon 80 ratas macho de la sepa Wistar entre 200 g y 250 g. Alojadas en cajas individuales. Con acceso libre a agua y alimento.

Los sujetos se mantuvieron en un ciclo luz-oscuridad 12 hrs. / 12 hrs. La luz se encendía a las 8 am.

#### 3.2.2 *Aparatos*

Se utilizó el laberinto de Barnes. Este laberinto consiste en una plataforma circular blanca de 120 centímetros de diámetro elevada a 90 centímetros del suelo, en su periferia se encuentran distribuidos 40 agujeros de 6 centímetros de diámetro. En cada uno de estos agujeros se puede colocar una cámara de 25 cm x 12 cm que conocemos como túnel de escape. Se emplea una cámara cilíndrica de 20 cm de diámetro y 45 cm de alto (Ilustración 5).

El laberinto se encuentra en un cuarto de registro, en algunas de las paredes se colocan cuadros u objetos que sirven como claves y estas nunca se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mueven de su lugar. El cuarto de registro se encuentra iluminado por luz blanca. Durante las sesiones de entrenamiento se utiliza un ruido blanco a 90 decibeles como estímulo aversivo.

Esta prueba conductual permite evaluar la estrategia que los sujetos emplean al resolver una tarea de tipo espacial. Para producir el estímulo auditivo aversivo se utilizó una caja productora de ruido blanco.

Para registrar los entrenamientos así como la calificación de los mismos se utilizó una cámara de video, una video casetera y un monitor.

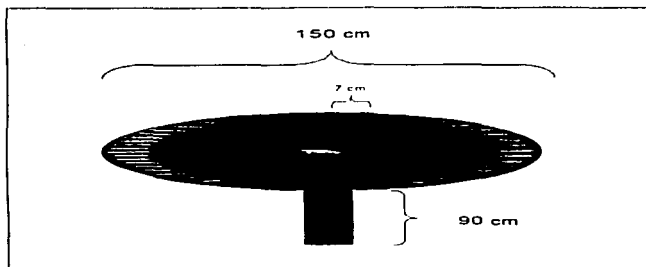


Ilustración 5 Laberinto de Barnes

### 3.2.3 Fármacos

- o Arachidonylethanolamide (anandamide) o anandamida, en una concentración de 4 mg/kg (0.01152 mmol).
- o cis-9,10-octadecenoamide (oleamide) u oleamida, en una concentración de 3.2 mg/kg (0.01138 mmol).
- o Se utilizó como vehículo etanol al 5% en solución salina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las dosis fueron seleccionadas de acuerdo a reportes previos (Galicia y cols, 2002)

Los dos endocannabinoides fueron obtenidos de la casa comercial Sigma Aldrich, St Louis MO. USA.

### 3.2.4 Procedimiento

Los sujetos fueron divididos en 8 grupos, cuatro de ellos para la fase de luz y cuatro para la fase de oscuridad. Se dividieron como sigue:

- Anandamida Luz (Ana Luz) N=10
- Oleamida Luz (Ole Luz) N=10
- Combinación Luz (Comb Luz) N=10
- Vehículo Luz (Veh Luz) N=10
- Anandamida Oscuridad (Ana Osc) N=10
- Oleamida Oscuridad (Ole Osc) N=10
- Combinación Oscuridad (Comb Osc) N=10
- Vehículo Oscuridad (Veh Osc) N=10

El experimento se llevó a cabo en 5 días consecutivos de entrenamiento. Cada día estaba dividido en 4 ensayos consecutivos, de este modo al concluir los 5 días de entrenamiento los sujetos habían realizado 20 ensayos. Las luces del cuarto de entrenamiento permanecieron prendidas durante todos los ensayos, incluidos aquellos en los que los sujetos fueron entrenados durante la fase de oscuridad.

El tiempo total de cada día de entrenamiento fue en promedio de 30 minutos por sujeto. Este tiempo incluye entrenamiento y administración de los fármacos. Para los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad, estos 30 minutos fueron en único tiempo que permanecieron fuera de su ciclo de luz-oscuridad normal. El laberinto de Barnes y la forma de entrenamiento se describen a continuación:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.2.4.1 Laberinto de Barnes:

El laberinto de Barnes es una prueba que permite la evaluación de estrategias para resolver una tarea de tipo espacial. El objetivo de esta tarea es que los sujetos localicen el túnel de escape con ayuda de las "claves espaciales" localizadas en las paredes del cuarto, se trata de evitar que los sujetos utilicen otra forma de orientación como la olfativa, auditiva o vestibular. Con el fin de que el sujeto se ubique espacialmente, el túnel de escape siempre se encuentra en una misma posición espacial con respecto del cuarto.

Antes de iniciar cada ensayo el laberinto se limpia con una solución de cloro y es rotado aleatoriamente con el fin de evitar que los sujetos utilicen algún otro método de ubicación (olfativo o vestibular). Además, durante todos los ensayos siempre esta presente un ruido blanco que además de fungir como estímulo aversivo, también funciona para evitar ubicación por algún sonido ajeno al experimento. La forma de entrenar se describe a continuación:

Justamente antes y solamente antes de iniciar el primer ensayo de la primera sesión de entrenamiento, se introduce al sujeto en el túnel de escape por un minuto con el fin de habituarlo al lugar donde debe llegar. Al concluir este minuto se retira al sujeto y se le introduce en la cámara cilíndrica que se coloca justo en el centro del laberinto. Todos los ensayos posteriores al primer ensayo del primer día de entrenamiento inician con el sujeto colocado directamente en la cámara cilíndrica.

Una vez que el sujeto se encuentra en la cámara cilíndrica se enciende el ruido blanco, se le permite estar ahí por diez segundos, al concluir este periodo se retira la cámara cilíndrica y se permite que el sujeto explore el laberinto libremente hasta por 4 minutos, durante este periodo el ruido blanco se mantiene constante.

Cuando el sujeto logra encontrar el túnel de escape y se introduce en el, se apaga el ruido blanco y se detiene el cronómetro. Cuando el sujeto ha ingresado

al túnel de escape, se le permite estar ahí por un minuto, al término de este tiempo se da por concluido el ensayo. Después se saca al sujeto y se le coloca nuevamente en la cámara cilíndrica y el proceso se repite. Este proceso se repite 4 veces consecutivas por sesión (día), y esto se repite por cinco días consecutivos.

En el laberinto de Barnes se califica el tiempo, los errores, las perseverancias, la distancia y la estrategia. A continuación se detalla cada variable:

*Tiempo:* Esta variable se refiere al tiempo que el sujeto tarda en resolver la prueba, es decir, el tiempo en encontrar e introducirse en el túnel de escape. El tiempo empieza a contarse a partir de la liberación del sujeto en el laberinto, es decir, de que se levanta la cámara cilíndrica y se detiene justamente cuando el sujeto se ha introducido completamente en el túnel de escape.

*Errores:* La variable errores se refiere al número de veces que el sujeto explora un agujero que no es aquel donde se encuentra el túnel de escape. Se contabiliza un error cuando el sujeto inclina la cabeza sobre un agujero.

*Perseverancias:* Este es también un tipo de error, se refiere al número de veces que el sujeto explora un agujero que ya había explorado en el mismo ensayo.

*Distancia:* La distancia se refiere al número de agujeros existentes entre el primer agujero que el sujeto exploró y el agujero donde se encuentra el túnel de escape en cada ensayo. Para medir la distancia el laberinto se divide en dos partes iguales, de esta forma la distancia máxima en cualquier dirección a partir del túnel de escape será 20.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Estrategias:* Existen diferentes tipos de estrategias para resolver el laberinto de Barnes, en este trabajo se consideran tres tipos, la estrategia de tipo espacial, la estrategia de tipo serial y la estrategia aleatoria.

La estrategia de tipo espacial consiste en ir directamente del centro del laberinto al túnel de escape. Para que se considere que un ensayo fue resuelto con estrategia espacial se requiere que la *distancia* no sea mayor de dos, es decir, que los sujetos no exploren en un rango no mayor de dos agujeros a ambos lados del túnel de escape (Ilustración 6 C).

La estrategia de tipo serial consiste en ir del centro del laberinto hacia cualquier agujero y explorar uno por uno cada agujero en una sola dirección hasta llegar al túnel de escape (Ilustración 6 B).

La estrategia de tipo aleatoria consiste en ir hacia cualquier agujero y explorar en desorden los agujeros hasta encontrar el túnel de escape (Ilustración 6 A).

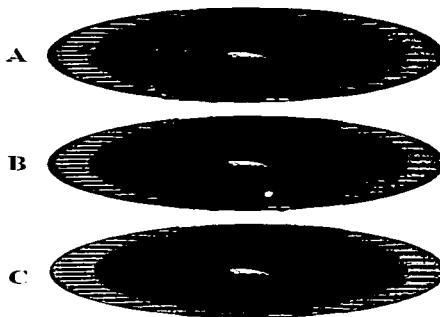


Ilustración 6 Estrategias para resolver el Laberinto de Barnes. A) Estrategia Aleatoria B) Estrategia Serial C) Estrategia Espacial

### 3.2.4.2 Administración

Los fármacos fueron administrados por vía intraperitoneal en una dosis de 11  $\mu$ moles por kilogramo de peso. Esto corresponde 4 miligramos por kilogramo para anandamida y 3.2 miligramos por kilogramo para oleamida.

El vehículo y los fármacos fueron administrados en volúmenes no mayores a 400 microlitros.

Las administraciones fueron realizadas inmediatamente después de concluir el último ensayo del primero, segundo, tercero y cuarto día de entrenamiento. Este esquema de administración permite observar los efectos de los endocannabinoides sobre la consolidación de la memoria sin afectar la adquisición de la tarea.

### 3.2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba ANOVA de una sola vía para medidas repetidas, las pruebas *Post Hoc* que se aplicaron fueron LSD y Bonferroni.

Todas las pruebas fueron realizadas con el programa para estadística SPSS data editor para Windows versión 8.0



### 3.3 Resultados

Los resultados correspondientes a las variables de tiempo, errores, distancia y perseverancia se presentan en las tablas 1, 2 3 y 4 respectivamente. Los casos en donde hubo alguna diferencia significativa están marcados con un asterisco. Cada uno de los grupos experimentales fue comparado contra el grupo control de la fase del ciclo a la que pertenece. El grupo de vehículo de oscuridad fue comparado con el grupo vehículo de luz y las diferencias significativas entre ellos están marcadas en ambas filas.

Los resultados correspondientes a las estrategias empleadas para resolver el laberinto se presentan en las figuras 1 a 21. Cada uno de los grupos experimentales fue comparado contra el grupo de vehículo de la fase correspondiente. En el caso de los grupos control, fueron comparados uno contra otro, es decir, vehículo luz contra vehículo oscuridad.

#### TIEMPO

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 6
Veh luz	79.8 ± 16.6	39.0 ± 8.4	26.2 ± 2.4	22.5 ± 3.8	23.4 ± 5.8
Veh osc	68.3 ± 11.9	28.8 ± 3.0	24.2 ± 2.6	19.5 ± 2.7	15.8 ± 2.2
Ana luz	53.6 ± 7.2	48.3 ± 7.7	54.3 ± 8.0 *	39.2 ± 8.6 *	29.4 ± 5.9
Ana osc	75.4 ± 15.3	34.7 ± 6.1	24.6 ± 2.4	16.3 ± 1.2	10.8 ± 1.1
Ole luz	55.4 ± 7.7	29.5 ± 2.4	19.9 ± 2.5	43.0 ± 10.7 *	14.4 ± 2.0
Ole osc	57.6 ± 9.5	47.6 ± 9.1 *	28.7 ± 5.7	24.1 ± 4.1	26.5 ± 7.3
Com luz	49.1 ± 8.7	28.4 ± 3.9	25.1 ± 4.3	18.1 ± 2	11.9 ± 1.6
Com osc	57.1 ± 7.7	24.3 ± 3.7	20.8 ± 5.4	14.2 ± 1.5	9.9 ± 1

Tabla 1 Tiempo de ejecución con error estándar en el laberinto de Barnes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ERRORES

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Veh luz	14.9 ± 2.7	9.2 ± 1.5	7.7 ± 0.8	6.5 ± 1.3	5.4 ± 1.7 *
Veh osc	15.9 ± 2.9	11.5 ± 1.4	11.7 ± 1.9	9 ± 1.5	8.7 ± 1.6 *
Ana luz	10.7 ± 1.7	14.7 ± 2.3	16.7 ± 2.2 *	9.3 ± 1.5	6.1 ± 0.8
Ana osc	19.8 ± 5.6	15.2 ± 2.6	11.7 ± 1.8	10.0 ± 0.8	5.2 ± 0.8 *
Ole luz	16.5 ± 2.7	10 ± 1.5	7.8 ± 1.5	11.5 ± 2.8 *	4.325 ± 1.2
Ole osc	12.2 ± 2.4	12.9 ± 2.0	12.5 ± 2.7	9.3 ± 1.4	6.95 ± 0.9
Com luz	13.2 ± 2.3	12.7 ± 2.3	11.8 ± 1.6	9.6 ± 1.1	5.1 ± 0.6
Com osc	15 ± 2.0	13.0 ± 1.8	10.3 ± 2.2	7.0 ± 0.9	5.5 ± 0.9

Tabla 2 Errores de ejecución con error estándar en el laberinto de Barnes

## PERSEVERANCIA

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Veh luz	3.8 ± 1	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.1 ± 0.4	1.2 ± 0.7
Veh osc	3.9 ± 1.2	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.7	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.3
Ana luz	2.3 ± 0.7	3.5 ± 0.8	4.6 ± 1.3 *	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.3
Ana osc	7.1 ± 2.8	3.8 ± 1.5 *	1.9 ± 0.7	1 ± 0.4	0.7 ± 0.2
Ole luz	5.4 ± 1.5	2.4 ± 0.8	1.0 ± 0.3	4.3 ± 1.9 *	1.6 ± 0.6
Ole osc	3.5 ± 1.1	3.1 ± 0.7	3.3 ± 1.7	1.6 ± 0.5	1.9 ± 0.4
Com luz	2.9 ± 0.7	2.3 ± 0.9	2.4 ± 0.7	1.6 ± 0.5	0.6 ± 0.3
Com osc	2.7 ± 0.6	1.6 ± 0.7	2.9 ± 1.2	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.3

Tabla 3 Perseverancias con error estándar en el laberinto de Barnes

## DISTANCIA

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Veh luz	8.4 ± 1.0	8.5 ± 0.7	6.2 ± 1.3	6.2 ± 1.0	4.1 ± 0.8 *
Veh osc	9.2 ± 1.2	10.2 ± 1.0	8.2 ± 0.7	8.0 ± 1.3	7.4 ± 1.0 *
Ana luz	7.5 ± 0.7	9.9 ± 0.9	8.7 ± 1.3	8.9 ± 0.9	5.4 ± 0.9
Ana osc	8.5 ± 1.3	9.1 ± 1.1	7.7 ± 0.4	8.1 ± 1.4	4.8 ± 0.9
Ole luz	8.4 ± 1.1	5.8 ± 0.7 *	5.3 ± 1.0	5.1 ± 0.7	3.2 ± 0.8
Ole osc	5.6 ± 0.7	7.8 ± 0.9	8.0 ± 0.8	7.4 ± 0.9	6.7 ± 1.4
Com luz	6.3 ± 0.8	7.4 ± 1.0	9.0 ± 1.2	7.6 ± 1.2	6.3 ± 0.7
Com osc	8.4 ± 1.1	9.2 ± 0.9	9.3 ± 1.0	7.4 ± 0.7	4.3 ± 0.8 *

Tabla 4 Distancias con error estándar en el laberinto de Barnes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Vehículo Luz vs Vehículo oscuridad

**Estrategia aleatoria:** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de vehículo luz y vehículo oscuridad con respecto a la estrategia aleatoria. (Fig. 1)

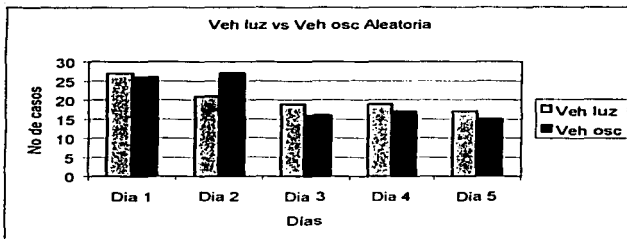


Figura 1 Muestra la estrategia seria de los grupos de vehículo en la fase de luz y en la fase de oscuridad

**Estrategia serial:** El grupo entrenado durante la fase de oscuridad mostró una cantidad significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo entrenado durante la fase de luz en los días 4º y 5º de entrenamiento. (Fig. 2)

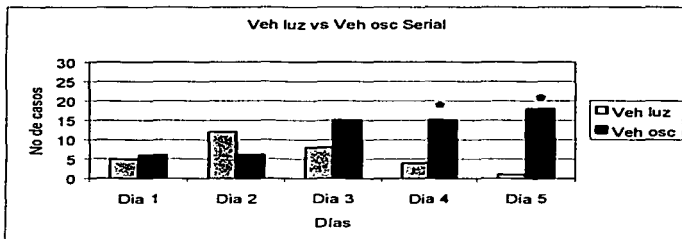


Figura 2 Muestra la estrategia serial de los grupos vehículo en la fase de luz y en la fase de oscuridad

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Estrategia espacial:** El grupo de la fase de luz mostró una cantidad significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo de la fase de oscuridad en los días 4° y 5° de entrenamiento. (Fig. 3)

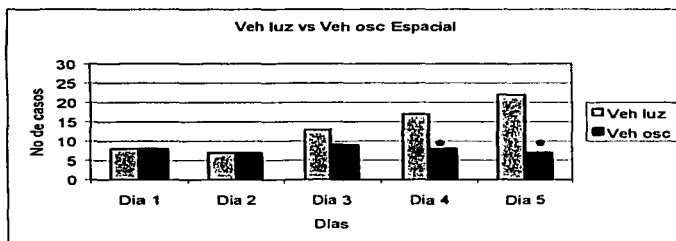


Figura 3 Muestra la estrategia espacial de los grupos vehículo en la fase de luz y en la fase de oscuridad

#### Anandamida Luz vs Vehículo Luz

**Estrategia aleatoria:** El grupo de anandamida luz mostró una incidencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la estrategia aleatoria en el 4o día de entrenamiento con respecto al grupo control. (Fig. 4)

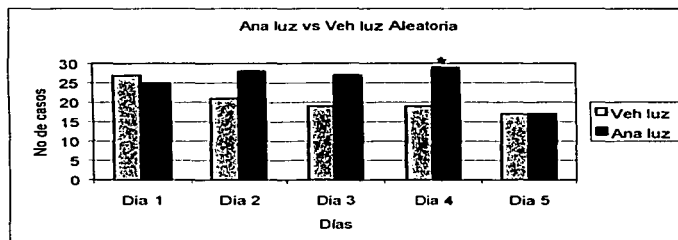


Figura 4 Muestra la incidencia en la estrategia aleatoria para los grupos de anandamida luz y vehículo luz

**Estrategia serial:** El grupo de anandamida de luz mostró una incidencia significativamente mayor por la estrategia serial en el 5° día de entrenamiento con respecto al grupo control. (Fig. 5)

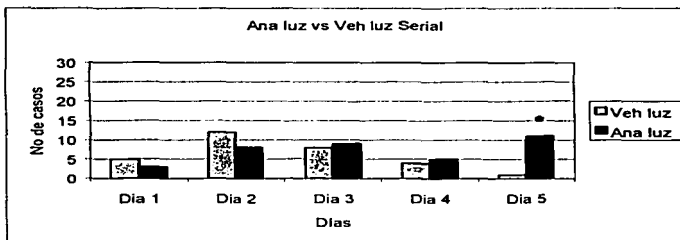


Figura 5 Muestra la incidencia en la estrategia serial para los grupos de anandamida luz y vehículo luz

**Estrategia espacial:** El grupo de anandamida mostró una incidencia significativamente menor por la estrategia espacial en los días 3°, 4° y 5° de entrenamiento con respecto al grupo control. (Fig. 6)

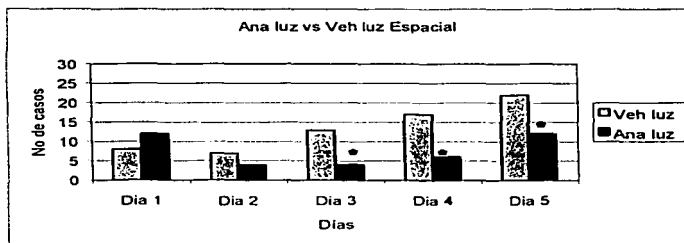
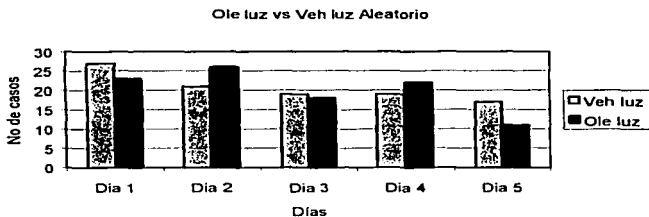


Figura 6 Muestra la incidencia en la estrategia espacial para los grupos de anandamida luz y vehículo luz

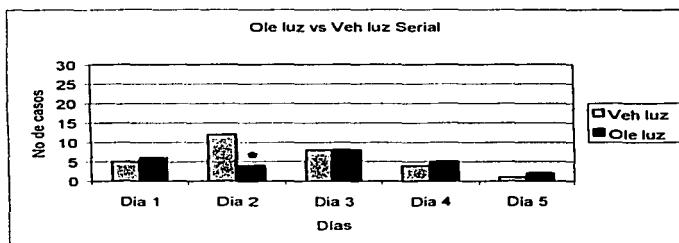
### Oleamida Luz vs Vehículo Luz

*Estrategia aleatoria:* No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de oleamida luz y vehículo luz con respecto a la estrategia aleatoria. (Fig.7)



**Figura 7** Muestra la tendencia hacia la estrategia aleatoria para los grupos de oleamida luz y vehículo luz

*Estrategia serial:* Los sujetos del grupo de oleamida luz mostraron tendencias significativamente menores hacia la estrategia serial ( $p < 0.05$ ) en el 2o día de entrenamiento con respecto al grupo control. (Fig. 8)



**Figura 8** Muestra la tendencia hacia la estrategia serial para los grupos de oleamida luz y vehículo luz

**Estrategia espacial:** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de oleamida luz y vehículo luz con respecto a la estrategia espacial. (Fig.9)

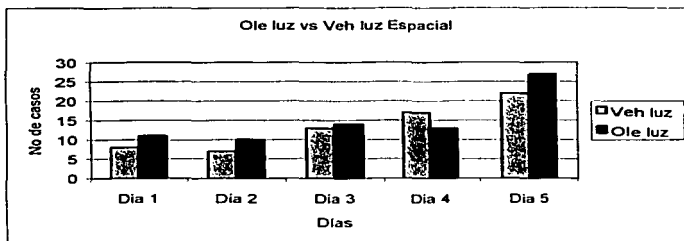


Figura 9 Muestra la tendencia hacia la estrategia espacial para los grupos de oleamida luz y vehículo luz

#### **Combinación luz vs Vehículo luz**

**Estrategia aleatoria:** No se observaron diferencias con respecto a la estrategia aleatoria entre los grupos de combinación luz y vehículo luz. (Fig. 10)

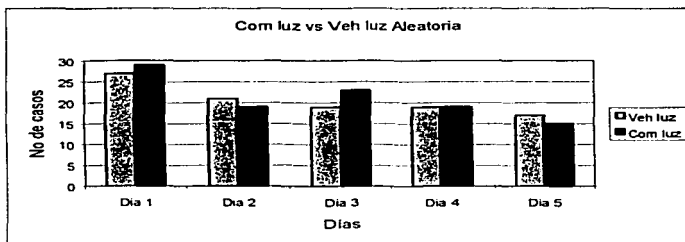
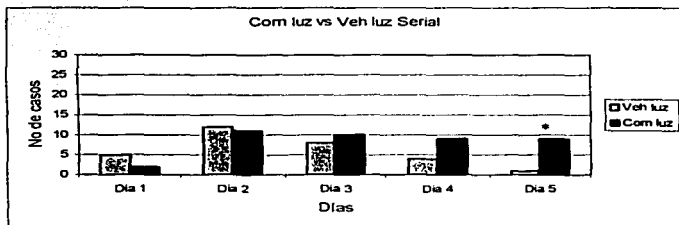


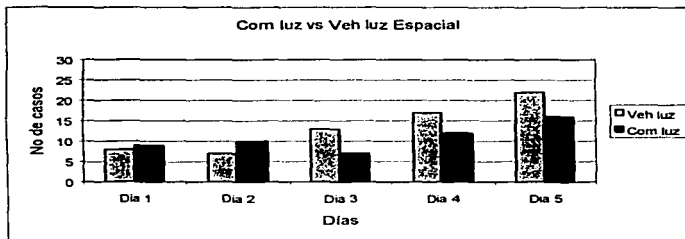
Figura 10 Muestra la tendencia hacia la estrategia aleatoria de los grupos de combinación luz y vehículo luz

**Estrategia serial:** El grupo de combinación luz mostró una tendencia significativamente mayor hacia la estrategia de tipo serial ( $p < 0.05$ ) en el 5º día de entrenamiento con respecto al grupo control. (Fig. 11)



**Figura 11** Muestra la tendencia hacia la estrategia serial de los grupos de combinación luz y vehículo luz

**Estrategia espacial:** No se observaron diferencias significativas con respecto a la tendencia hacia la estrategia espacial entre los grupos de combinación luz y vehículo luz. (Fig. 12)

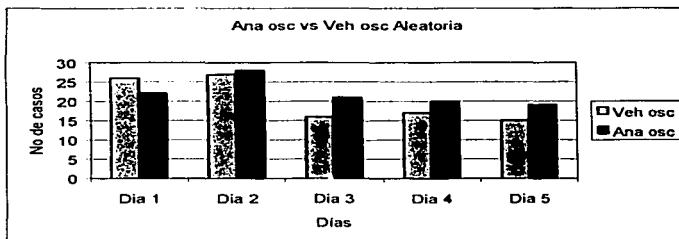


**Figura 12** Muestra las tendencias hacia la estrategia espacial de los grupos de combinación luz y vehículo luz



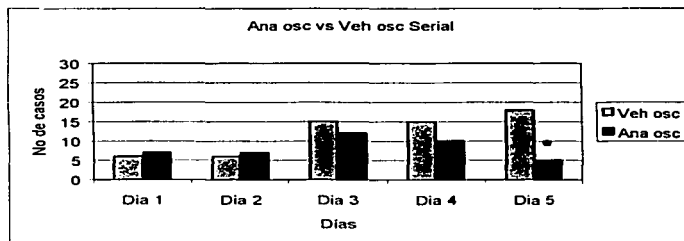
### Anandamida oscuridad vs vehículo oscuridad

**Estrategia aleatoria:** No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de anandamida oscuridad y vehículo oscuridad con respecto a las tendencias hacia la estrategia aleatoria. (Fig. 13)



**Figura 13** Muestra la tendencia hacia la estrategia aleatoria de los grupos de anandamida oscuridad y vehículo oscuridad

**Estrategia serial:** Los sujetos del grupo de anandamida oscuridad mostraron una tendencia significativamente menor ( $p < 0.05$ ) hacia la estrategia serial que los sujetos del grupo control, esto en el 5º día de entrenamiento. (Fig. 14)



**Figura 14** Muestra la tendencia de los grupos anandamida oscuridad y vehículo oscuridad hacia la estrategia serial

**Estrategia espacial:** Pudo observarse una tendencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) hacia la estrategia espacial por parte del grupo de anandamida oscuridad con respecto al grupo de vehículo oscuridad, esto en el 5° día de entrenamiento. (Fig. 15)

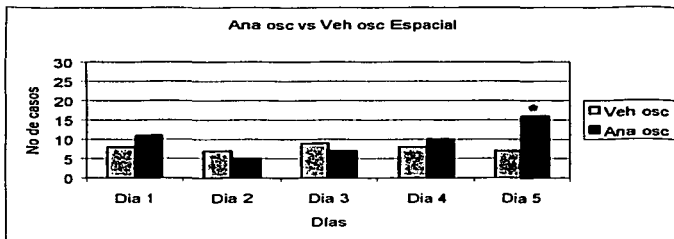


Figura 15 Muestra la tendencia de los grupos de anandamida oscuridad y vehículo oscuridad hacia la estrategia espacial.

**Oleamida oscuridad vs Vehículo oscuridad**

**Estrategia aleatoria:** Se observó una tendencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en el 3er día de entrenamiento con respecto al grupo control. (Fig. 16)

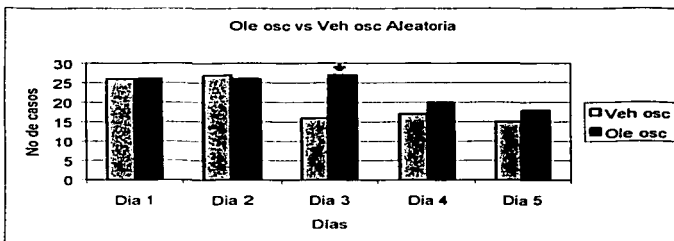


Figura 16 Muestra la tendencia hacia la estrategia aleatoria de los grupos de oleamida oscuridad y vehículo oscuridad.

**Estrategia serial:** Pudo observarse una tendencia significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en los días 3° y 5° de entrenamiento hacia la estrategia serial por parte del grupo de oleamida oscuridad con respecto al grupo control. (Fig. 17)

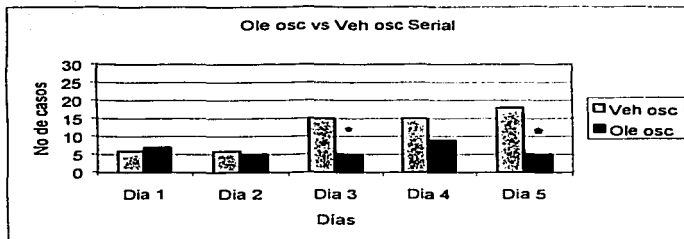


Figura 17 Muestra la tendencia hacia la estrategia serial por parte de los grupos de oleamida oscuridad y vehículo oscuridad

**Estrategia espacial:** Los sujetos del grupo de oleamida oscuridad mostraron una tendencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) hacia la estrategia espacial en el 5° día de entrenamiento que los sujetos control. (Fig. 18)

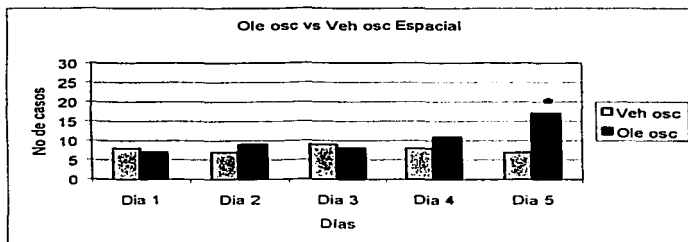


Figura 18 Muestra las tendencias hacia la estrategia espacial por parte de los grupos oleamida oscuridad y vehículo oscuridad

### Combinación oscuridad vs Vehículo oscuridad

**Estrategia aleatoria:** Pudo observarse una tendencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) hacia la estrategia aleatoria en el 3er día de entrenamiento por parte del grupo de combinación oscuridad con respecto al grupo control. (Fig. 19)

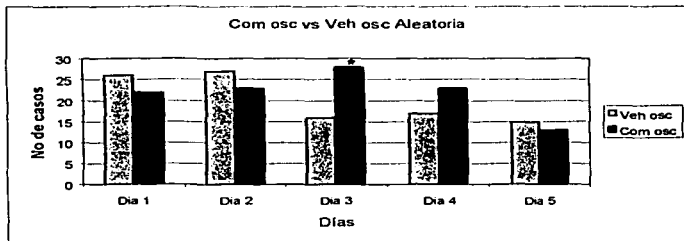


Figura 19 Muestra las tendencias hacia la estrategia aleatoria de los grupos de combinación oscuridad y vehículo oscuridad

**Estrategia serial:** Pudo observarse una tendencia significativamente menor ( $p < 0.05$ ) hacia la estrategia serial en los días 3º, 4º y 5º por parte del grupo de combinación oscuridad con respecto al grupo de vehículo oscuridad. (Fig. 20)

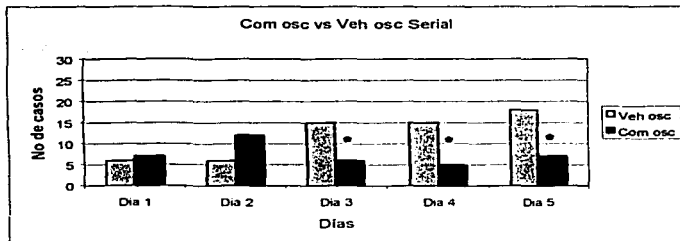


Figura 20 Muestra las tendencias hacia la estrategia serial de los grupos de combinación oscuridad y vehículo oscuridad

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Estrategia espacial:** Se observó una tendencia significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) hacia la estrategia espacial en el 5° día de entrenamiento por parte del grupo de combinación oscuridad con respecto al grupo de vehículo oscuridad. (Fig. 21)

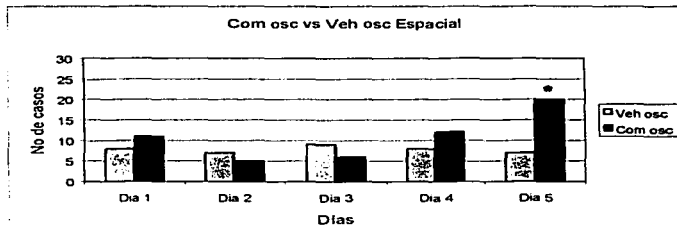


Figura 21 Muestra las tendencias hacia la estrategia espacial de los grupos de combinación oscuridad y vehículo oscuridad

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Capítulo IV**

### **Discusión y conclusión**

## 4.1 Discusión

### 4.1.1 Grupos control

Los resultados muestran que el número de casos registrados con estrategia aleatoria se mantuvo igual independientemente de la fase del ciclo en el que los sujetos fueron entrenados (Fig.1). Sin embargo se obtuvieron diferencias significativas entre las estrategias utilizadas para resolver el laberinto, esto es, los sujetos que fueron entrenados en la fase de oscuridad utilizaron principalmente una estrategia de tipo serial (Fig. 2), mientras que los sujetos que fueron entrenados en la fase de luz utilizaron preferentemente una estrategia de tipo espacial (Fig. 3).

También se encontró un incremento en el número de errores y una mayor distancia para los sujetos entrenados en la fase de oscuridad en el 5º día de entrenamiento (Tabla 2 y Tabla 4). Estos datos concuerdan con el empleo de una estrategia serial, dado que para ser considerada como tal el sujeto debe recorrer uno por uno los agujeros hasta encontrar el túnel de escape. Un aspecto importante a tomar en cuenta es el hecho de que el tiempo y las perseverancias se mantuvieron sin cambios en ambas fases del ciclo (Tabla 1 y Tabla 3).

Estos resultados muestran que los sujetos aprendieron la solución de la tarea de forma diferente dependiendo de la fase del ciclo en la que fueron entrenados, y tal vez podríamos hablar de una forma de aprender matizada por las condiciones del medio. En la literatura ya se han mencionado algunos casos de conductas dependientes del ciclo luz-oscuridad, por ejemplo, la ingesta de alimento o el sueño. Otros procesos como la temperatura cerebral también varían a lo largo del ciclo (Perron y cols, 2001).

Los experimentos, como ya se mencionó antes, fueron realizados específicamente a la 1:00 y a las 13:00 horas, puntos del ciclo donde se

encontraron altas y bajas concentraciones de receptores CB1 en hipocampo respectivamente (Martínez-Vargas y cols, 2002), lo que sugiere que el efecto de aprendizaje diferencial podría ser dependiente del sistema canabínérgico, sin que esta posibilidad excluya a otros sistemas de neurotransmisión que probablemente estuvieran variando su expresión a lo largo del ciclo también.

#### 4.1.2 Anandamida

La administración de anandamida durante la fase de luz produjo un aumento significativo en el tiempo de ejecución en los días 3º y 4º comparado con el grupo control de la fase de luz (Tabla 1), así mismo, la cantidad de errores y la cantidad de perseverancias aumentó en el 3er día de entrenamiento (Tabla 2 y Tabla 3) mientras que la distancia se mantuvo sin cambios (Tabla 4). Con respecto a las estrategias se puede observar una disminución significativa en el empleo de la estrategia espacial en los días 3º, 4º y 5º de entrenamiento (Fig. 6). Mientras que hubo un aumento por utilizar la estrategia aleatoria en el 4º día (Fig. 4) una tendencia hacia la estrategia espacial que obtuvo significancia en el 5º día de entrenamiento.

Tomando en cuenta el aumento en el tiempo de ejecución, los errores y las perseverancias en el 3er día de entrenamiento, y el aumento en el tiempo en el 4º día, parecería indicar un déficit en la consolidación de la memoria. Sin embargo, en el 5º día de entrenamiento los tiempos, errores y perseverancias son similares a los del grupo control. Estos resultados muestran un déficit pasajero causado por el aumento en las concentraciones normales del endocanabinoide anandamida.

Para este mismo grupo, otros resultados interesantes son los que surgen de la evaluación de las estrategias empleadas para resolver el laberinto. Se puede observar que en los días 3º, 4º y 5º de entrenamiento los sujetos dejan de utilizar una estrategia espacial. Además muestran una tendencia a utilizar una estrategia



aleatoria en el 4º día de entrenamiento, y lo más interesante es que para el 5º día de entrenamiento los sujetos muestran una tendencia significativa hacia la estrategia de tipo serial.

Lo que se observa en el 5º día de entrenamiento puede considerarse como un cambio en la estrategia para resolver el laberinto, además, este cambio es dependiente de las concentraciones normales de anandamida y coincide con la recuperación del tiempo de ejecución, el número de errores y las perseverancias. De esta forma, los sujetos entrenados bajo el tratamiento con anandamida pasaron de un déficit en el 3er día de entrenamiento principalmente, a un cambio de estrategia para resolver el laberinto en los mismos tiempos y con la misma cantidad de errores que los sujetos del grupo control.

Lo sujetos que fueron entrenados en la fase de oscuridad bajo el tratamiento de anandamida no mostraron diferencias en los tiempos de ejecución, errores o distancia con respecto al grupo control de la fase de oscuridad (Tabla 1, Tabla 2 y Tabla 4). Con respecto a la perseverancia mostraron un aumento significativo en el 2º día de entrenamiento (Tabla 3). Con respecto a la estrategia de tipo aleatoria se mantuvo igual que la del grupo control de la misma fase (Fig. 13). Pudo observarse una tendencia a disminuir la estrategia serial obteniendo significancia en el 5º día de entrenamiento (Fig. 14), por el contrario, pudo observarse una tendencia a aumentar la estrategia de tipo espacial que obtuvo significancia en el 5º día de entrenamiento (Fig. 15).

Los datos de anandamida en la fase de oscuridad muestran que los sujetos experimentales no tuvieron déficit en la solución de la tarea, si no que cambiaron la estrategia de resolver el laberinto, además, y como en el grupo de anandamida en la fase de luz, el cambio de estrategia es dependiente de la administración de anandamida.

Lo que puede observarse en ambas fases del ciclo es que la administración de anandamida cambia la estrategia para resolver el laberinto. Este cambio, es similar al que ocurre por el simple cambio de ciclo, es decir, los sujetos que son entrenados en la fase de luz utilizan preferentemente una estrategia de tipo espacial. Si en esta fase los sujetos son tratados con anandamida, los resultados muestran una tendencia hacia la estrategia serial, como aquellos sujetos que son entrenados en la fase de oscuridad. Por el contrario si los sujetos son administrados con anandamida en la fase de oscuridad dejan de utilizar una estrategia serial y muestran una tendencia hacia la estrategia espacial, de forma similar a los sujetos que son entrenados en la fase de luz.

La interacción de anandamida con el receptor CB1 es una fuerte evidencia de que los cambios en la estrategia dependientes del ciclo luz-oscuridad, son también dependientes del sistema canabinérgico, que como ya se mencionó varía su expresión de sus receptores a lo largo del día.

Estos datos también muestran que anandamida modula la forma de aprender la solución de un laberinto espacial y esta modulación es dependiente del ciclo luz-oscuridad, con lo que la hipótesis del sistema canabinérgico como mecanismo modulador de la memoria se fortalece.

#### 4.2.2 Oleamida

Los sujetos entrenados en la fase de luz que fueron tratados con oleamida mostraron tendencias significativamente mayores en el 4º día de entrenamiento con respecto a tiempo de ejecución (Tabla 1), el número de errores (Tabla 2) y las perseverancias (Tabla 3), mientras que la distancia mostró diferencias significativas en el 2º día de entrenamiento con respecto al grupo control (Tabla 4). Los datos muestran una disminución en la tendencia a utilizar la estrategia de tipo

serial en el segundo día de entrenamiento (Fig. 8), mientras que la estrategia aleatoria y espacial se mantuvo sin cambios (Fig. 7 y Fig. 9).

La administración de oleamida durante la fase de luz muestra un efecto en el día 4 sin que este se vea reflejado en las estrategias; sin embargo, los tiempos se ven afectados lo que podría hablar de un déficit en la ejecución causado por la alteración de los niveles normales de oleamida. Este efecto se recupera al siguiente día de entrenamiento.

Durante la fase de oscuridad, los sujetos tratados con oleamida mostraron tiempos significativamente mayores que los sujetos control, mientras que las variables errores, perseverancia y distancia se mantuvieron sin cambios. Las estrategias sin embargo variaron en los días 3º y 5º, mostrando tendencias a disminuir la estrategia serial (Fig. 17), y a aumentar la estrategia espacial en el 5º día (Fig. 18) y a aumentar la estrategia aleatoria en el 3er día (Fig. 16).

Estos datos son similares a los de anandamida en la fase de oscuridad, muestran un cambio en la estrategia dependiente de la alteración normal de oleamida, y en el quinto día los datos muestran significativa la tendencia a la estrategia espacial.

Al igual que anandamida, oleamida parece inducir un cambio de estrategia durante la oscuridad a aquella empleada en la fase luz, en este caso, oleamida parece tener sus mayores efectos durante la fase de oscuridad, es decir, parece que el efecto de cambio de estrategia con oleamida, depende de la fase de oscuridad, que es cuando la los receptores a canabinoides presentan las menores concentraciones.

#### 4.1.3 Combinación Anandamida-Oleamida

La combinación de anandamida y oleamida durante la fase de luz no muestra diferencias con el grupo control, a pesar de que se nota una cierta tendencia a aumentar la estrategia serial como lo haría anandamida, estas diferencias no alcanzan a ser significativas.

Durante la fase de oscuridad la combinación no mostró diferencias en cuanto al tiempo de ejecución, los errores, las perseverancias o la distancia, sin embargo, las estrategias sí cambiaron, los sujetos mostraron una tendencia menor hacia la estrategia serial en los días 3º, 4º y 5º (Fig. 20), mientras que la estrategia aleatoria mostró una tendencia a aumentar en el 3er día (Fig. 19) y la estrategia espacial mostró una tendencia a aumentar mostrándose significativa en el 5º día de entrenamiento (Fig. 21).

La administración de ambos endocannabinoides juntos podría hacer pensar en una potenciación de los efectos canabinérgicos; sin embargo, los resultados no muestran este efecto, inclusive, los efectos durante la fase de luz se ven disminuidos, probablemente por una competencia entre ambos cannabinoides. Durante la fase de oscuridad los efectos se muestran similares a los de la administración de anandamida u oleamida solos.

Los datos mostrados sustentan la hipótesis de que el sistema canabinérgico modula la consolidación de la memoria y este tipo de modulación es dependiente del ciclo luz oscuridad, dado que los receptores a cannabinoides varían su expresión a lo largo del día y los resultados muestran que en el punto donde las mas altas concentraciones a cannabinoides se encuentran los sujetos resuelven el laberinto de forma espacial, mientras que cuando las concentraciones de CB1 son mas bajas los sujetos resuelven de forma serial, esto en condiciones normales. Si se administran cannabinoides endógenos, estos efectos se ven alterados, mostrando un cambio en las estrategias empleadas para resolver la tarea.

La administración de cannabinoides endógenos parece invertir el ciclo, haciendo que los sujetos resuelvan la tarea en la forma en que la resolverían cuando se encuentran en la fase contraria del ciclo, estos datos concuerdan con los datos mostrados por Perron R. y cols (2001) donde la administración de  $\Delta^9$ -THC invierte el ciclo de temperatura en ratas.

#### 4.1.4 Memoria, endocannabinoides y variaciones diurnas

Los resultados obtenidos pueden ser buenas herramientas para entender un poco más acerca de cómo funciona el proceso de memoria en general.

La pregunta pertinente en este momento es, ¿cómo es que la alteración de un sistema modulador modifica la estrategia utilizada para resolver una tarea?. La respuesta tendría implicaciones en diversos niveles. A nivel molecular, sería interesante saber exactamente cuales son los sistemas de neurotransmisión sobre los cuales el sistema canabinérgico está actuando. Para esto, algunos estudios publicados a la fecha podrían ayudarnos. Por ejemplo, la acción sobre la liberación de GABA, glutamato, acetilcolina o dopamina, en distintas partes del cerebro, como el hipocampo, el núcleo accumbens, o la corteza cerebral (Gessa y cols., 1998; Sullivan, 2000; Cristopoulos y Wilson, 2001; Pistis y cols., 2002).

Por otro lado, estos datos también aportan información para la comprensión del funcionamiento del proceso general de memoria. Los datos presentados en este estudio pueden ayudar a formar un panorama general de cómo es que un sistema modulador influye en el resultado final de la memoria.

La administración de endocannabinoides hace patente su papel modulador en el proceso de memoria, esto además de aportar información valiosa del funcionamiento del sistema canabinérgico, muestra que la memoria puede tener distintos niveles de funcionamiento. Esto es, en un primer plano podrían estar los

neurotransmisores implicados en el funcionamiento del almacenamiento de la información, es decir, los ejecutores de la memoria, por ejemplo, el glutamato. En un segundo plano estarían los neurotransmisores encargados de la modulación del funcionamiento de los sistemas principales. Aquí se contaría al sistema canabinérgico.

Estos datos sugieren al proceso de memoria como un proceso dinámico, dependiente importantemente de la modulación de sistemas secundarios. El hecho de que la alteración de un sistema modulador como el canabinérgico influya en el resultado final del proceso de memoria, sin destruirlo por completo, habla de la elasticidad del proceso mismo. En este contexto, podríamos hablar de una parte rígida del proceso de memoria, un ejecutor diseñado para el almacenamiento de información. Por otro lado, podríamos hablar de un sistema modulador diseñado para matizar las capacidades del ejecutor principal, es decir, un sistema auxiliar en el tipo de información que debe almacenarse.

La existencia de sistemas moduladores, que podrían considerarse sistemas secundarios de memoria, confieren al proceso mnemico amplias capacidades adaptativas, que en el plano de la vida cotidiana serían de vital importancia. Este tipo de sistemas deberían ser entonces, los sistemas encargados de la elasticidad del sistema de memoria.

Por otro lado, los resultados con respecto al efecto dependiente del ciclo luz-oscuridad, sugieren la subordinación de un sistema modulador de memoria a las exigencias del medio. Estos datos hacen aun mas evidente, la capacidad de adaptación del sistema de memoria, y que esta capacidad esta dispuesta de tal forma que pueda enfrentar un medio ambiente cambiante.

## 4.2 Conclusiones

1. Los sujetos de los grupos control muestran un aprendizaje diferencial de la tarea dependiendo de la fase del ciclo luz-oscuridad en la que se encuentren. Para la fase de oscuridad los sujetos utilizan principalmente una estrategia serial, mientras que para la fase de luz los sujetos utilizan preferentemente una estrategia espacial.
2. La administración de anandamida i.p. modifica la forma de aprender la tarea en ambas fases del ciclo, sin que esto signifique un déficit en la ejecución. El efecto de anandamida se ve reflejado en la estrategia que los sujetos emplean para resolver la tarea. Durante la fase de luz la elección de una estrategia espacial cambia por una estrategia serial. Durante la fase de oscuridad la elección de una estrategia serial cambia por una estrategia espacial.
3. La administración de oleamida modifica la forma de aprender la tarea en la fase de oscuridad, sin que esto signifique un déficit en la ejecución. Este efecto se ve reflejado en la elección de la estrategia. La estrategia serial es cambiada por una estrategia espacial.
4. La administración de la combinación anandamida-oleamida muestra efectos únicamente en la fase de oscuridad. Aquí la estrategia serial es cambiada por estrategia espacial.
5. Los efectos de la administración de endocannabinoides en la ejecución de la tarea, así como el efecto diferencial dependiente de la fase del ciclo luz-oscuridad, muestran que el sistema canabínrgico modula la forma de aprender una tarea espacial y este efecto es dependiente de variaciones diurnas.

## Referencias

1. Ameri A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. Progress in neurobiology, 58, 315-348.
2. Barnes C. A. (1979). Memory deficits associated whit sencence: A neurobiological and behavioral study in the rat. Journal of comparative and physiological psychology, 93, 74-104.
3. Badeley A. (1998). Memoria Humana, Teoria y Practica. Sevilla, España. McGraw Hill.
4. Bennett M. R. (2000). The concept of long term potentiation of transmission at synapses. Progress in Neurobiology, 60, 109-137.
5. Bisogno T., Berrendero F., Ambrosino G., Cebeira M., Ramos J. A., Fernandez-Ruiz J., Di Marzo V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. Biochemical and Biophysical Research Communications 256, 377-380.
6. Chan-Palay V., Köhler C. (1998). The hippocampus, New Vistas. Neurology and neurobiology, vol 52.
7. Cheer J. F., Cadogan A. K., Mardsen C. A., Fone K. C. F., Kendall D. A. (1999). Modification of 5-HT2 receptor mediated behavior in the rat by oleamide and the role of cannabinoid receptors. Neuropharmacology, 38, 533-541.
8. Christopoulos A., Wilson K. (2001). Interaction of anadamide with the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. Brain Research, 915, 70-78.



9. Cravatt B. F., Giang D. K., Mayfield S. P., Boger D. L., Lerner R. A., Gilula N. B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature, **384**, 83-87.
10. Cravatt B. F., Prospero-García O., Siuzdak G., Gilula N. B., Henriksen S.J., Boger D. L., Lerner R. A. (1996). Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. Science, **268**, 1506-1509.
11. Devane W. A., Dysarz F. A., Johnson M. R., Melvin S. L., Howlett A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Molecular Pharmacology, **34**, 605-613.
12. Devane W. A., Hanus I., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science, **258**, 1946-1949.
13. Deutsch D. G., Chin S. A. (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. Biochemical Pharmacology, **46**, 791-796.
14. Egertova M., Elphick M. R. (2000). Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-Terminal Tail of CB1. The Journal of comparative neurology, **122**, 159-171.
15. Felder C. C., Nielsen A., Briley E. M., Palkovits M., Priller J., Axelrod J., Nguyen D. N., Richardson J. M., Rigglin R. M., Koppel G. A., Paul S. M., Becker G. W. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues

- of human and rat. Federation of European biochemical societies letters, 393, 231-235.
16. Galicia O., González-Lira B., Méndez-Díaz M., Gonzalez-Rivera R., Rueda-Orozco P., Navarro L., Prospéro-García O. (2002). The effect of anandamide and oleamide on the P300 potential of the rat depends on light-dark cycle. APSS 16<sup>th</sup> annual meeting Seattle, Washington USA, June 8-12.
17. Gessa G. L., Casu M. A., Carta G., Mascia M. S. (1997) Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR141716. European Journal of Pharmacology, 327, R1-R2.
18. Gessa G. L., Casu M. A., Carta G., Mascia M. S. (1998). Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. European Journal of Pharmacology, 355, 119-124.
19. Glass M., Dragunow M., Faulk R. L. M. (1997). Cannabinoids receptor in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. Neuroscience, 77, 299-318.
20. Hodges H., Peters S., Gray J. A., Hunter A. J. (1999). Counteractive effects of a partial (Sabcomeline) and a full (RS8) muscarinic receptor agonist on deficits in radial maze performance induced by S-AMPA lesions of the basal forebrain and medial septal area. Behavioural Brain Research 99, 81-92.
21. Hao S., Yosefa A., Mechoulam R., Berry E. M. (2000). Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. European Journal of Pharmacology, 392, 147-156.

22. Kandel E. (2000). Principles of neural science USA: MacGraw Hill.
23. Kandel E. (2001). Nobel Lecture, 8 December 2000. Bioscience Reports, Vol. 21 No. 5, 556-611.
24. Litchman A. H., Martin B. R., (1996) Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. Psychopharmacology, 126, 125-131.
25. Martínez-Vargas M., Murillo-Rodríguez E., González-Rivera R., Landa A., Velásquez-Moctezuma J., Prospéro-García O., Navarro L. (2001) Cannabinoid Rceptor 1 increases with sleep rebound. Society for neuroscience 32 annual meeting, San Diego CA, USA November 10-15 2001.
26. Mason K., Mallet P. E., Jhamandas K., Boegman R. J., Beninger R. J. (1999). Nucleus basalis injections of N-metil-D-aspartate enhance memory of rats in the double Y-maze. Brain Reserch Bulletin, 48, 67-71.
27. Murillo-Rodríguez E., Sanchez-Alavez M., Navarro L., Martinez-Gonzalez D., Drucker-Colin R., Prospero-Garcia O. (1998). Anandamide modulates sleep and memory in rats. Brain Research, 812, 270-274.
28. Murillo-Rodríguez E., Giordano M., Cabeza R., Henriksen S. J., Mendez-Diaz M., Navarro L., Prospero-García O. (2001). Oleamide modulates memory in rats. Neuroscience Letters, 313, 61-64.
29. Ong W. Y., Mackie K. (1999). A light electron microscopic study if the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. Neuroscience, 92, 1177-1191.

30. Osawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system Progress in Neurobiology, 54, 581-618.
31. Perron R. R., Tyson R. L., Sutherland G. R., (2001).  $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol increases brain temperature and inverts circadian rhythms. Neuroreport, 12, 3791-3794
32. Perry E., Walker M., Grace J., Perry R. (1999). Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness. Trends in Neuroscience, 22, 273-280.
33. Pettit D. A. D., Harrison M. P., Olson J. M., Spencer R. F., Cabral G. A. (1988) Immunohistochemical Localization of the Neural Cannabinoid Receptor in Rat Brain. Journal of Neuroscience Research, 51, 391-402.
34. Pistis M., Ferraro L., Pira L., Flore G., Tanganelli S., Gessa G. L., Devoto P. (2002)  $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. Brain Research, 948, 155-158
35. Ruscke A. C. White G. K. (1999). Facilitation of memory performance by a novel muscarinic agonist in young and old rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 63, 663-667.
36. Schlicker E., Kathmann M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends in Pharmacological Sciences, 22, 565-572.
37. Sullivan J. M. (1999) Mechanisms of cannabinoid- receptor- mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. The American physiological society, 1286-1294.

38. Sullivan J. M. (2000) Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. Learning and Memory, 7, 132-139.
39. Tsuo K., Brown S., Sañudo-Peña M. C., Mackie K., Walker J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience, 83, 393-411.
40. Ye L., Qi J. S., Qiao J. T. (2001) Long-term potentiation in hippocampus of rats is enhanced by endogenous acetylcholine in a way that is dependent of N-metil-D-aspartate receptors. Neuroscience letters, 300, 145-148.

## **Anexo**

### **El paciente H.M.**

En la década de los 50s Brenda Milner reportó el estudio de HM, un paciente de 27 años de edad con crisis convulsivas intratables a causa de una disfunción bilateral de los lóbulos temporales. Por esta razón, el paciente estaba incapacitado para tener una vida normal, así que se decidió practicarle una cirugía de ablación bilateral de dichas áreas que inclulan la formación hipocampal, la amígdala y partes del área multimodal de asociación de la corteza temporal.

Después de esta operación, la epilepsia de HM fue controlada, pero en su lugar quedo un déficit de memoria muy específico. El paciente conservaba una memoria de corto plazo normal, de segundos a minutos, además tenía una perfecta memoria de largo plazo para eventos que ocurrieron antes de la operación, no presentaba problemas de lenguaje. Su déficit consistía en la incapacidad de pasar nueva información del almacén de corto plazo al almacén de largo plazo. El estaba imposibilitado para retener información de personas, lugares o hechos por mas de unos minutos. Además tenía el mismo problema con la orientación espacial, se dice que le tomo mas de un año aprender la ubicación de su nueva casa.

Por otro lado, HM no tenía problemas para resolver tareas de memoria implícita, como seguir los contornos de una estrella a través de un espejo. Estudios con otros pacientes con las mismas lesiones muestran no tener problemas en tareas como el recuerdo por claves (priming), en otros casos se reporta que los sujetos no tienen problemas para resolver tareas implícitas como rompecabezas, sin embargo aunque su rendimiento fuera mejorando con el pasar los días (como los sujetos normales) los pacientes reportaban no haber trabajado en la tarea con anterioridad.