



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“PARTICIPACIÓN DE PKC EN EL ÁREA CA3 DE HIPOCAMPO
DURANTE LA ADQUISICIÓN Y/O CONSOLIDACIÓN DE UNA TAREA
ESPACIAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GRACIELA IVONNE MAR ALVAREZ



TUTORA

M en C. WENDY VERÓNICA HERRERA MORALES

2007



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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente.

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Participación de PKC en el área de CA3 de hipocampo durante la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial"

realizado por **Mar Alvarez Graciela Ivonne**, con número de cuenta **09921055-7**, quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr.	Oscar Prospero García	
Propietario	M. en C.	María de los Angeles Aguilar Santamaría	
Tutor(a) Propietario	M. en C.	Wendy Verónica Herrera Morales	
Suplente	Biól.	Rita Virginia Arenas Rosas	
Suplente	Biól.	Luis Núñez Jaramillo	

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 04 de mayo del 2007
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi entero agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible este trabajo. Ante todo a Wendy V. Herrera Morales, directora de este proyecto, por su confianza, orientación, asesoramiento y especialmente por su valiosa amistad, la cual sabré conservar como el tesoro que es. Igualmente quiero agradecer a Luis Núñez Jaramillo el apoyo, confianza, dedicación, su inagotable paciencia y la amistad depositada en mí.

A mi entrañable compañera de trabajo y amiga Bárbara P. Serrano Flores, por toda su ayuda, orientación, comprensión, confianza, paciencia, pláticas eternas, su valiosa compañía durante arduas horas de trabajo y principalmente por su valiosa amistad. Tantas cosas que contar y tan poco espacio, gracias por todo y por ser mi sinónimo de amistad.

A mis amigos, Cecy, Carmen, Alma, Mariana, Esme, Gaby, Emma, Anuar, Dany, Rafael, Ale, Miguel; por mencionar algunos ya que la lista es larga; a todos gracias por su apoyo, compañía, enseñanzas, interés en el tema de esta tesis, los buenos momentos de fiesta, ocio, las pláticas enriquecedoras y de chisme, salidas de campo y clases.

Doy gracias al destino por haber jugado a mi favor, por hacer que coincidiéramos en un mismo tiempo y espacio, teniendo la confianza de que seremos por mucho tiempo uno parte del otro.

Este trabajo se llevo a cabo gracias la asistencia técnica de Federico Jandete (Histología, IFC UNAM).

*A mis padres,
por toda su dedicación, paciencia,
desvelos, apoyo incondicional y sobre todo su AMOR*

*A mis hermanos,
por su ejemplo, apoyo, cuidados,
cariño y los buenos momentos juntos.*

*A Geovany,
por esa mente tan curiosa que tiene todo niño
al crecer y que muchas veces me metió en apuros.*

Según vamos adquiriendo conocimiento,
las cosas no se hacen más comprensibles,
sino más misteriosas.

Albert Schweitzer

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
I. Introducción	
1. Aprendizaje y memoria	1
1.1 Sistemas de memoria	3
1.2 Memoria espacial	7
1.3 Hipocampo y sistemas de neurotransmisión	8
1.3.1 Hipocampo y su relación con la memoria espacial	13
1.4 Proteína cinasa C (PKC)	17
1.4.1 Estructura molecular y mecanismos de activación	18
1.5 Vesículas sinápticas en las terminales nerviosas	21
1.5.1 Sinaptofisina	22
II. Antecedentes	24
III. Hipótesis	29
IV. Objetivos	29
V. Material y Método	30
5.1 Animales	30
5.2 Cirugía estereotáxica	31
5.3 Manipulación	31
5.4 Tratamiento	31
5.5 Paradigma conductual	32
5.6 Histología	33
5.7 Homogenización	34
5.8 Cuantificación de proteínas	34
5.9 Western Blot	34

5.10 Análisis de imágenes	36
5.11 Análisis Estadístico	36

VI. Resultados.

6.1 Verificación de la implantación de la cánula	37
6.2 Efecto del inhibidor de PKC en el aprendizaje de una tarea espacial ..	37
6.2.1 Efecto del inhibidor de PKC en la MLP de una tarea espacial ...	38
6.3 Cambio en la cantidad de Syp en el área de CA3 en ratas entrenadas y control de nado	41
6.4 Expresión de sinaptofisina en el área de CA3 del hipocampo asociada al entrenamiento en el laberinto de agua, bajo el efecto de la inactivación de PKC en dicha área	42

VII. Discusión.

7.1 Participación de PKC en la consolidación de una memoria espacial.....	44
7.2 Cambio en la expresión de Syp en al área de CA3	49

VIII. Conclusiones

51

IX. Perspectivas

52

X. Referencias

53

TABLA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AKAP	Proteínas de anclaje a cinasas
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxasolpropionato
aPKC	Isoforma atípica de PKC
APV	D(-)-2-amino-5-ácido fosfonoaléxico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5-trifosfato
Bryo	Briostantina
C1	Región conservada 1 dominio regulatorio
C2	Región conservada 2 dominio regulatorio
C3	Región conservada 3 dominio catalítico
C4	Región conservada 4 dominio catalítico
CA1	Cuerno de Ammon 1
CA3	Cuerno de Ammon 3
CaMK-II	Proteína cinasa dependiente de calcio/cadmodulina II
CE	Corteza Entorrinal
cPKC	Isoforma convencional de PKC
CREB	Camp response element binding protein
CS	Colaterales de Schaffer

DAG	Diacilglicerol
FM	Fibras Musgosas
GD	Giro Dentado
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i> (Potenciación a Largo Plazo)
mAChR	Receptores muscarínicos de Acetilcolina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MARCKS	Sustratos de cinasa C ricos en alanina miristoilada
MD	Memoria Declarativa
MEK	Cinasa mitógeno/ERK
mGluRs	Receptores Metabotrópicos de Glutamato
MLP	Memoria a Largo Plazo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSF	Factor sensible a n-etilmaleimida
nPKC	Isoforma nueva de PKC
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PS	Fosfatidilserina
RACKs	Receptor para cinasa C activada

RICKs	Receptores para la cinasa C inactiva
Sb	Subículum
SNARE	Complejo: sintaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina
SNC	Sistema Nervioso Central
Syn	Sinaptofisina
VP	Vía Perforante
VS's	Vesículas Sinápticas

RESUMEN

El hipocampo es una estructura del SNC cuya participación es crucial en los procesos de memoria y aprendizaje, principalmente de tipo declarativo; en la última década el área de CA3 del hipocampo ha cobrado gran importancia en el estudio de los mecanismos que subyacen el aprendizaje espacial debido a su capacidad plástica y al papel que juega la circuitería interna del hipocampo.

Actualmente se sabe que la proteína cinasa C (PKC) está ampliamente distribuida en el hipocampo y su actividad juega un papel importante en la transducción de señales, por lo cual se ha relacionado con el aprendizaje y la memoria, sin embargo, aún no es clara su participación en los procesos de adquisición y consolidación de la memoria espacial.

En el presente estudio se investigó la participación de PKC en el área de CA3 del hipocampo, mediante un inhibidor de PKC (Quelerritrina), durante la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial en el laberinto acuático de Morris. También se estudió la relación entre los procesos de adquisición y consolidación de una tarea espacial en animales tratados con Quelerritrina, con la expresión de sinaptofisina en el área de CA3.

Se encontró que la administración de Quelerritrina en el área CA3 del hipocampo antes del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris no tiene efecto alguno en el aprendizaje de una tarea espacial pero si en la consolidación de la memoria a largo plazo de la misma. Asimismo, la inhibición de PKC en CA3 produce una diferencia significativa en la expresión de sinaptofisina en dicha área, siendo menor en los individuos tratados con quelerritrina, esto posiblemente asociado al déficit conductual mostrado en el establecimiento de la memoria espacial a largo plazo.

I. INTRODUCCIÓN

1. Aprendizaje y Memoria.

El aprendizaje y la memoria son dos procesos que ocurren en el Sistema Nervioso Central (SNC) que se encuentran íntimamente relacionados (Squire 2001), siendo estos de los principales mecanismos de adaptación en los animales.

Entendemos por aprendizaje a la capacidad que poseen los organismos para adquirir nuevos conocimientos, los cuales producen cambios en la conducta y en el SNC. Estos pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos. Por otra parte, la memoria es el proceso por el cual se retiene este conocimiento por algún tiempo que puede ser tan largo como la vida del sujeto (Kandel, 1992). El hecho de que la conducta sea modificable en función del ambiente es posible gracias a una serie compleja de procesos que tienen lugar en el cerebro. Estos cambios pasan por etapas como son la adquisición, consolidación y evocación de diferentes tipos de información. La adquisición de la información a través de los sentidos constituye necesariamente el primer paso, la cual es seguida por el proceso de consolidación, que conlleva a su estabilización de forma gradual, permitiendo que los procesos endógenos activados por una experiencia modulen la persistencia de la traza de memoria.

La evocación, reactiva los recuerdos almacenados para que puedan ser usados como guía de la conducta (Routtenberg, 2001)

Cajal en 1911, fue el primero en proponer que los cambios anatómicos entre las conexiones neurales eran la base física del aprendizaje y soporte de la memoria. Demostró que el sistema nervioso se componía de unidades discretas, las neuronas, interconectadas entre sí por medio de las llamadas sinápsis; y supuso que en estas uniones podían ocurrir cambios como consecuencia de la actividad de dichas neuronas dando como resultado el almacenamiento de la información. (Op cit. Almaguer-Melián & Bergado-Rosado, 2002). Asimismo,

Sherrington en 1886, propuso el término de plasticidad sináptica para describir los cambios en las propiedades funcionales de una sinapsis como resultado de su actividad; este término se refiere a la posibilidad de inducir cambios que pueden o no ser reversibles. Estos cambios pueden ser a nivel morfológico. Esta idea fue formalizada más tarde por Hebb en 1949, donde propone la plasticidad asociativa, como el mecanismo por el que la coincidencia de actividad pre y postsináptica podría modificar las conexiones neurales en determinadas estructuras del cerebro.

Más tarde, en 1973 se encontraron las primeras evidencias experimentales en apoyo a las suposiciones de Cajal y Hebb; es decir, las sinapsis tienen capacidad de modificarse como consecuencia de su actividad. Bliss y Lomo (1973) demostraron que en muchas estructuras nerviosas se produce este cambio, el cual consiste en la facilitación duradera de la transmisión sináptica como resultado de la activación de una sinapsis por la estimulación de las neuronas presinápticas con estímulos umbrales de alta frecuencia (Op. cit Bennett, 2000). A este fenómeno se le denominó potenciación sináptica a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés *Et al*).

Se ha demostrado que en muchas estructuras nerviosas se produce LTP, aunque se ha estudiado con más frecuencia en tres sinapsis del hipocampo (estructura límbica, asociada al aprendizaje declarativo): 1) en la sinapsis de la vía perforante con giro dentado, 2) en las sinapsis de las células granulares del giro dentado con las células piramidales del subcampo CA3, y 3) en las sinapsis de las células piramidales del subcampo CA3 con las células piramidales del subcampo CA1.

La LTP tiene dos propiedades que, de acuerdo con Hebb, eran características de los mecanismos fisiológicos del aprendizaje y memoria. En primer lugar, la LTP puede durar mucho tiempo, durante muchas semanas después de varias estimulaciones. En segundo lugar, la LTP se produce solamente si el disparo de la neurona presináptica va seguido por el disparo de la neurona postsináptica. Diferentes trabajos sobre la iniciación y mantenimiento de la plasticidad sináptica

en el hipocampo demuestran que tanto el aprendizaje como la LTP inducida producen cambios en la estructura, la distribución y el número de las sinapsis, lo que podría constituir la base estructural de la memoria (Klintsova & Greenough, 1999, Lamprecht & LeDoux, 2004).

La memoria a corto plazo nos permite almacenar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo. Es una memoria frágil y transitoria que resulta muy vulnerable a cualquier tipo de interferencias, se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares, en las redes neurales implicadas. Pero si tales cambios persisten pueden activar procesos moleculares tales como: la maquinaria de receptores (activación, reclutamiento o síntesis de más receptores y moléculas asociadas a estos), apertura de canales, activación de cinasas, transcripción de ARNm y dar lugar a síntesis de nuevas proteínas y cambios estructurales dando paso a la consolidación de la memoria, la cual es entendida como un diálogo entre genes y sinapsis (Kandel & Hawkins, 2001), teniendo como resultado el establecimiento de una memoria a largo plazo, la cual nos permite almacenar una gran cantidad de información durante tiempo ilimitado, siendo una memoria más estable y duradera, y poco vulnerable a interferencias (McGaugh, 1996).

La duración del proceso de consolidación está en relación al curso temporal que siguen los procesos celulares y moleculares subyacentes al aprendizaje, y depende de las interacciones de los diferentes sistemas de memoria.

1.1 Sistemas de memoria.

De acuerdo a sus características conductuales y a las estructuras cerebrales implicadas, se ha establecido dos sistemas de memoria de largo plazo: la memoria no declarativa y la memoria declarativa (Squire, 1996). [Figura 1].

La memoria no-declarativa, es la memoria de las cosas que solemos hacer. Su expresión es en gran medida automática, “inconsciente” y difícil de verbalizar. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica. Derivada de tipos de

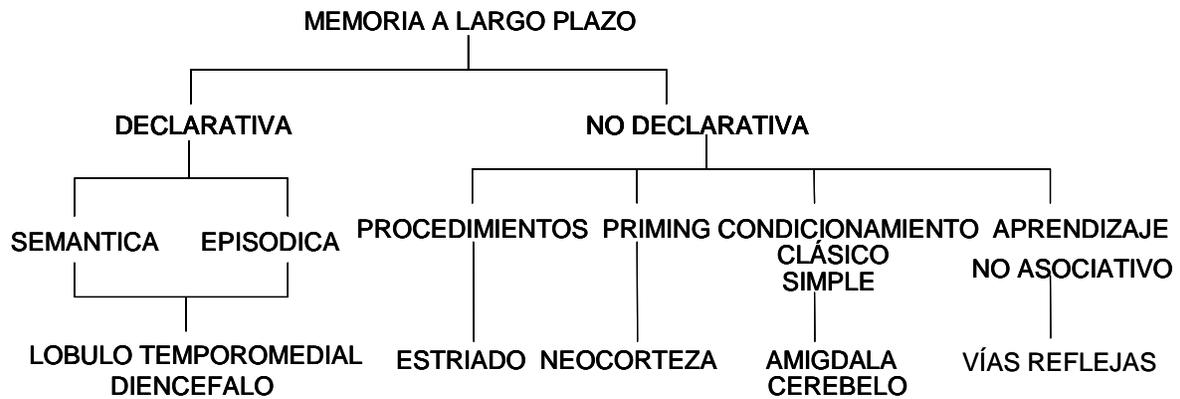


Figura 1.- Clasificación de los sistemas de memoria a largo plazo con las estructuras del cerebro involucradas en cada sistema (Modificado de Squire, 1996).

aprendizaje básicos y filogenéticamente antiguos, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor, o los condicionamientos clásico e instrumental (Bermúdez-Rattoni & Escobar, 2000). Su principal lugar de almacenamiento radica en estructuras subcorticales, como el neostriado (caudado y putamen) aunque también pueden estar involucradas otras estructuras corticales (Morgado 2005).

Un buen ejemplo, ampliamente estudiado en diferentes laboratorios, es el miedo condicionado en ratas, una forma de condicionamiento clásico cuya adquisición y expresión es altamente dependiente de la amígdala. En humanos también se ha demostrado el importante papel de la amígdala en el procesamiento de la memoria no declarativa ligada a estímulos emocionales. Como aspecto relevante, se ha observado que un estímulo condicionado aversivo, consistente en una cara de aspecto desagradable, puede provocar una respuesta de miedo incluso cuando su presentación es breve e inmediatamente enmascarada por otra cara neutral, de tal modo que el sujeto no llega a percibirlo conscientemente (Morris, *et al.*, 1998).

Por otro lado la memoria declarativa (MD) resulta del aprendizaje racional, se adquiere en pocos ensayos y tiene como destacada peculiaridad, poder expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original. Su

adquisición se relaciona con el sistema hipocampal y otras estructuras del lóbulo temporomedial.

La MD está dividida en memoria episódica o de eventos, la cual contiene información referida al conocimiento sobre el mundo y experiencias vividas por cada persona, y la memoria semántica o de conceptos, referida a conceptos de objetos cotidianos dentro del vocabulario empleado por cada persona. Tener en cuenta estas dos subdivisiones de la MD es importante para entender de qué modo la información está representada y es recuperada diferencialmente.

La distinción de memoria semántica da cuenta de un almacén de conocimientos acerca de los significados de las palabras y las relaciones entre estos significados, constituyendo una especie de diccionario mental, mientras que la memoria episódica representa eventos o sucesos que reflejan detalles de la situación vivida y no solamente el significado. La organización de los contenidos en la memoria episódica está sujeta a parámetros espacio-temporales, esto es, los eventos que se recuerdan representan los momentos y lugares en que se presentaron. Sin embargo, la información representada en la memoria semántica sigue una pauta conceptual, de manera que las relaciones entre los conceptos se organizan en función de su significado.

Una participación muy confirmada de la MD es el conocido caso del paciente epiléptico HM, cuya extirpación bilateral del hipocampo y otras regiones del lóbulo temporomedial (1953) le produjo una grave amnesia anterógrada específica para aprendizajes relacionales, por lo que él puede leer todos los días el mismo periódico como si fuese nuevo y en general presenta dificultades en diferentes recuerdos declarativos, como el recordar personas que acaba de conocer o aprender un nuevo camino a su casa. Con ello podemos decir que el hipocampo parece estar especialmente relacionado con la consolidación de la MD, es decir, con su transferencia desde la memoria a corto plazo a la memoria a largo plazo (Milner *et al.*, 1998).

La diferencia entre MD y memoria no declarativa se estudió en pacientes amnésicos y de Parkinson, los cuales respondieron de manera diferenciada a una prueba de clasificación probabilística. Se trataba de aprender a predecir tiempo soleado o lluvioso con una combinación de las cartas que aparecían en la pantalla de una computadora, para aprender esta tarea se necesita de muchos ensayos, algo característico de la memoria no-declarativa. Los pacientes amnésicos aprendían normalmente, pero no recordaban nada de los episodios del entrenamiento. En contraste, los pacientes de Parkinson no aprendían la clasificación probabilística, pero tenían intactos los detalles de la situación del entrenamiento (Knowlton *et al.*, 1996). Esta doble disociación muestra que el hipocampo y las regiones del lóbulo temporomedial generalmente dañadas en los enfermos amnésicos y las regiones del neocórtex afectadas en Parkinson, se relacionan con sistemas de aprendizaje y memoria paralelos pero diferentes, es decir, con la MD y la memoria no-declarativa, respectivamente (Squire, 1996).

Otro buen ejemplo de MD es el aprendizaje que nos permite orientarnos en el espacio circundante, el cual está evidenciado en el trabajo de Maguire *et al.*, (1998), mediante neuroimágenes con tomografía por emisión de positrones en humanos, donde se muestra una clara y específica activación del hipocampo derecho cuando el sujeto recorre las calles de una ciudad en un juego de realidad virtual, indicando con ello la participación del hipocampo dentro del aprendizaje relacional y de gran importancia en el espacial.

Debido a las características conductuales de la memoria espacial, así como a la evidencia de la participación del hipocampo dentro de este tipo de aprendizaje; el aprendizaje que resulta de estas tareas así como su memoria forman parte de la MD.

1.2 Memoria espacial.

Numerosos estudios han mostrado que los animales pueden determinar la localización de una meta en función de las relaciones que guardan las claves espaciales del ambiente.

En 1978 O'Keefe y Nadel, realizaron una clasificación sistemática en la que estudiaron el problema de la representación del espacio en el sistema nervioso, englobando prácticamente todas las formas de navegación espacial mayoritariamente estudiadas en los laboratorios de experimentación animal. Sosteniendo que la navegación espacial puede desarrollarse empleando dos estrategias diferentes: las táxicas y las cartográficas. El aprendizaje táxico, a su vez, puede desarrollarse a través de dos mecanismos: el aprendizaje de orientación y el aprendizaje de guía. En el aprendizaje de orientación, los animales aprenden a emplear programas motores estereotipados y localizan el camino hacia un lugar dado por series de movimientos de orientación. De forma contraria, el aprendizaje de guía se basa en el empleo de estímulos señal hacia los que los animales aprenden a aproximarse por hallarse asociados con la meta. Sin embargo, el aprendizaje cartográfico se basa en la memoria de la localización del sitio con respecto a la configuración de pistas espaciales disponibles en el entorno, un ejemplo de este último es el laberinto acuático de Morris, el cual consiste en una piscina circular con agua y una plataforma colocada en un lugar previamente establecido a 1 centímetro por debajo del nivel del agua. Dado que no existen pistas locales de la posición de la plataforma, el animal tiene que navegar haciendo uso de las pistas externas al laberinto (Morris *et al.*, 1984).

Se ha demostrado que el daño hipocampal en ratas produce un déficit en el aprendizaje y memoria de tareas espaciales. Morris *et al.* (1986) realizaron experimentos con animales manipulados farmacológicamente con APV, antagonista del receptor tipo NMDA, en hipocampo dorsal, donde encontraron que el uso de APV daña el aprendizaje espacial, y que el bloqueo de los receptores de glutamato del tipo NMDA no modifica la transmisión sináptica basal del

hipocampo, pero previene la inducción de la LTP. Estos resultados sugieren que los receptores NMDA están implicados en el aprendizaje espacial y su consolidación.

Los estudios con lesiones indican que el daño del hipocampo o de las estructuras asociadas, fimbria fórnix, septum, corteza entorrinal, provocan graves y permanentes déficits en numerosas habilidades espaciales en la navegación (Morris, *et al.*, 1982,1990; Sutherland & Rodríguez AJ. 1989) por lo que esta estructura cerebral es de gran importancia en este aprendizaje y su consolidación.

1.3 Hipocampo y sistemas de neurotransmisión.

El hipocampo es una estructura límbica cortical, que desde los años cincuenta se sabe que está implicada en algunas formas de memoria (Penfield & Milner, 1958). Aunque no parece ser el almacén definitivo de contenidos de memoria bien establecidos, las evidencias clínicas y experimentales indican que el hipocampo cumple funciones importantes en la consolidación de la memoria (Milner, *et al.*, 1998). Aunque no se excluye su participación en otras formas de memoria, se sabe que está involucrado tanto en la memoria espacial como en otras formas de memoria explícita en humanos y animales (Eichenbaum 1999; Shapiro & Eichenbaum, 1999).

Esta estructura cerebral recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales a través de su principal puerta de entrada, la llamada vía perforante originada en la corteza entorrinal. Esta proyección es glutamatérgica y excitadora. Existen otras proyecciones al hipocampo de otro signo neuroquímico originadas principalmente en el área septo-medial (ASM) y en el núcleo de la banda diagonal de Broca vertical y horizontal, estas aferencias son de carácter colinérgico y GABAérgico, así como el núcleo *et al* de fibras serotonérgicas y el *et al* de fibras noradrenérgicas (Cassel, J. C. *et al.*, 1997; Bici & Kiss, 1998).

Al hipocampo se le incluye en el sistema llamado formación hipocámpal, en la cual se ubican además el giro dentado, el subículum, el presubículum, el parasubículum y la corteza entorrinal.

La formación hipocámpal presenta diversos tipos de neuronas. En la zona del giro dentado las neuronas forman tres capas claramente definidas:

- *Capa de células granulares o principales*: las dendritas de estas células se extienden perpendicularmente a la capa de células. Los axones de esas neuronas salen por el polo opuesto y son las llamadas fibras musgosas y se dirigen al hilus hasta alcanzar la región CA3.
- *Capa molecular*: ubicada sobre la capa de las células granulares.
- *Capa de células polimórficas o hilus*: ubicada debajo de la capa principal.

Propiamente el hipocampo se caracteriza por presentar una capa principal de neuronas, la capa de las células piramidales, que hace una trayectoria en forma de una C invertida y en la cual se distinguen tres regiones llamadas cuernos de Ammon y son: CA1, CA2 y CA3 (Amaral & Witter, 1989).

Las células piramidales de la región CA3 presentan un claro árbol dendrítico y emiten un axón. Las dendritas se dirigen al centro del hipocampo y hacia el giro dentado. En estas dendritas se encuentran numerosas espinas dendríticas que reciben inervación de terminales excitadoras. Estas espinas son de mayor tamaño y son inervadas por las fibras musgosas provenientes del giro dentado.

Los axones de las células piramidales de CA3 emiten colaterales, llamadas colaterales de Schaffer, que van a inervar a las células piramidales de CA1 (Amaral & Witter, 1989), así mismo cada una de estas células está conectada entre las demás formando una conexión reverberante.

Muchos modelos computacionales sugieren que CA3 es de gran importancia para el procesamiento de la información que llega a los subcampos del hipocampo, ya que se le relaciona con la organización de la misma, pues recibe información externa a través de las fibras musgosas así como de la vía perforante y de carácter interno mediante las interconexiones que existen en este subcampo como lo son las colaterales de Schaffer y las interneuronas presentes en CA3 (Lee, I. *et al.*, 2005).

Debido a la estructura de sus conexiones al área de CA3 se le denomina como un sitio de autoasociación, el cual ayuda a la adquisición y consolidación de la memoria declarativa, por lo que al inactivar esta región los individuos presentan déficit en estas dos capacidades (Florian & Rouillet, 2004; Stupien, G. *et al.*, 2003).

Además de las neuronas piramidales y granulares en CA3, existen numerosas interneuronas, las cuales forman toda una red neuronal ya que presentan conexiones entre ellas mismas y a su vez con las piramidales (Amaral & Witter, 1989).

El circuito de la formación hipocampal se inicia en las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal, formando la principal vía unidireccional. Los axones de estas neuronas inician una vía, la vía perforante que pasa por el subículum y termina en el giro dentado y en la región CA3 por medio de las Fibras Musgosas del hipocampo. Sin embargo, las neuronas ubicadas en la capa III de la corteza entorrinal proyectan directamente a CA1 y al subículum (figura 2).

Debido a su organización, el hipocampo facilita el registro de potenciales de campo, y el estudio de sus componentes permite hacer inferencias sobre la eficacia de la transmisión sináptica en sus poblaciones celulares; por ello, ha sido el modelo más utilizado para estudiar la LTP.

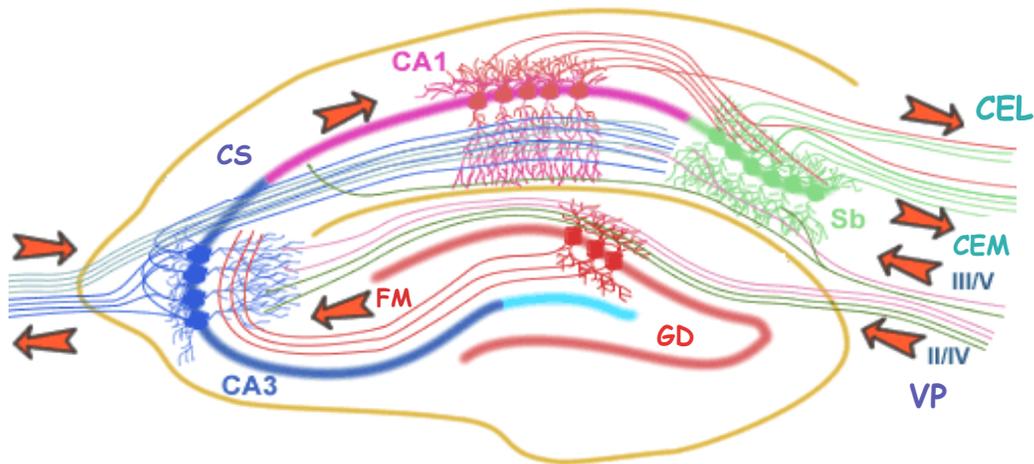


Figura 2.- Conexión Hipocámpica. Red hipocámpica: el hipocampo presenta una vía unidireccional principal la cual llega desde la Corteza Entorrinal llegando hasta el Giro Dentado (GD) y CA3 por medio de la vía Perforante (VP). Las neuronas de CA3 reciben información del GD vía fibras musgosas (FM). Estas presentan axones hasta las células piramidales de CA1 formando las colaterales de Schaffer (CS), así mismo CA1 está conectado con el Subículo (Sb) y CE permitiendo que la información regrese a este último

Los sistemas de neurotransmisión anteriormente mencionados presentan un sustento importante para el funcionamiento del hipocampo, ejemplo de ello es el glutamato. Entre sus principales subtipos de receptores se incluyen los receptores los metabotrópicos (mGluRs) y los ionotrópicos (tipo NMDA, kainato y AMPA), estos últimos se han relacionado con modelos de plasticidad sináptica como lo es la LTP, cambios en la distribución y número de sinapsis, en la cantidad de receptores, entre otros (Balderas, I. *et al.*, 2004; Linch, M.A. 2004). Esto debido a que permiten la entrada de Ca^{2+} incrementando su concentración en el interior de la célula lo cual desencadena una serie de cambios bioquímicos como la activación de cinasas, que tienen la capacidad de fosforilar otras moléculas. Se ha observado que la actividad del receptor tipo NMDA es esencial para la inducción y el mantenimiento de la LTP (Riegel, G & Reymann, 1996; Lamprecht & LeDoux, 2004), ya que al antagonizar el receptor se ve afectado este fenómeno, se ha observado que la inducción de LTP en cortes de hipocampo produce la formación de espinas dendríticas dorsales nuevas, además de un aumento en el tamaño de la cabeza de la espina dendrítica dorsal al cabo de 2 minutos posterior a la inducción y hasta 23 horas posterior al LTP. Todos estos cambios son bloqueados al antagonizar los receptores tipo NMDA (Lamprecht & LeDoux, 2004).

En cuanto a los receptores AMPA se ha encontrado que estos actúan en el mantenimiento de la morfología de las espinas dendríticas del hipocampo modulando el citoesqueleto de la espina dendrítica debido a que al antagonizar estos receptores la movilidad del citoesqueleto es fuertemente afectada y estas tienden a retraerse. Posterior a la inducción del LTP o al aprendizaje se ha observado que la cantidad de los receptores AMPA aumenta en las espinas dorsales, este incremento podría contribuir al mantenimiento de la plasticidad sináptica y posiblemente conlleve a la persistencia de la memoria (Lamprecht & LeDoux, 2004).

Otra vía de neurotransmisión de importancia es la colinérgica, la cual está asociada a la modulación de varias funciones cognitivas (Dutar, P., *et al.*, 1995). El sistema colinérgico presenta dos tipos de receptores: los muscarínicos (mAChR), acoplados a proteínas G y los receptores nicotínicos (N) que no conforman canales iónicos. Dentro de los muscarínicos (mAChR), se conocen cinco subtipos distintos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5), que se encuentran distribuidos de manera diferencial en el hipocampo siendo los de menor proporción los M_5 (Manzano-Palomo, M. *et al.*, 2006; Van der Zee & Luiten, 1999).

Los subtipos de mAChR median las acciones pre- (M_2 y M_4) y post (M_1 , M_3 , y M_5) sinápticas en hipocampo. Los mAChRs deprimen las respuestas inhibitoras y excitadoras, existe evidencia de que diversos subtipos de mAChR inhiben la liberación del glutamato, aspartato, ácido γ -aminobutírico, y la ACh. Dentro de estos subtipos existen algunos que pueden estar como autoreceptores, es el caso de M_2 y M_4 los cuales inhiben la liberación de ACh en hipocampo (Raiteri, M. *et al.*, 1984).

Se ha observado que la estimulación de los mAChR pre-sinápticos deprime la transmisión excitadora en las sinapsis de colaterales de Schaffer a CA1 y de las FM a CA3. Mientras que los mAChR post-sinápticos modulan la neurotransmisión sináptica excitatoria adentro del hipocampo. Un ejemplo de esta modulación ha sido observado en CA1 por medio del aumento en la sensibilidad de los receptores NMDA consecuente a la activación de M_1 .

Numerosos estudios han demostrado que el sistema colinérgico tiene una función moduladora durante la formación del aprendizaje y la memoria (Gold, P. 2003). Fadda *et al.*, (1996; 2000) observaron que posterior al aprendizaje de una tarea espacial y durante una tarea de memoria de trabajo, los niveles de acetilcolina hipocampal eran mayores en los individuos que realizaron las tareas que en aquellos que permanecieron quietos.

Se ha observado que la manipulación farmacológica del sistema colinérgico por medio de antagonistas (*i. e.* escopolamina) en el hipocampo afecta la formación del aprendizaje y memoria de tareas espaciales dependientes de esta estructura (Van der Zee, *et al.*, 1995; Herrera-Morales *et al.*, 2007).

1.3.1 Hipocampo y su relación con la Memoria Espacial.

Se tiene información que relaciona al hipocampo con el aprendizaje espacial. Estudios electrofisiológicos han demostrado que existen ciertas células que presentan actividad cuando la rata está en cierta posición o lugar. Estas son llamadas 'células de lugar' (O'Keefe & Dovstrovsky, 1971)

Básicamente, estas neuronas hipocampales incrementan su tasa de disparo cuando el animal se encuentra en un lugar concreto del espacio (Nadel, 1991), percibe un estímulo o desarrolla una conducta en un lugar determinado, lo cual indica que posiblemente los animales representen relaciones de tipo espacial con estas células. Principalmente son algunas neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 las que aumentan su actividad correlativamente a la posición del animal en el entorno, y permanecen así durante la exploración y la localización de lugares (Nadel, 1991; Wiener, *et al.*, 1989). Además, los campos receptivos de las células hipocampales están controlados por el entorno ya que, si rotamos las pistas, se produce también una rotación en los campos receptivos espaciales. No obstante, este control del contexto no se debe a una simple exposición a los estímulos, ya que, cuando se eliminan las pistas, la mayor parte de las células

muestran campos receptivos similares a los observados cuando las pistas están presentes, sin que dependa simplemente de la percepción visual (Muller & Kubie, 1989, Quirk, *et al.*, 1990).

Además de la importancia de las células de lugar hipocampales previamente descritas, se han descubierto poblaciones de neuronas que parecen ser relevantes en el establecimiento de las relaciones espaciales que se desarrollan en el hipocampo. Estas células se denominan genéricamente “neuronas de dirección de la cabeza” y fueron descritas por primera vez por Ranck (1984,1985) como células localizadas en el presubiculo dorsal, con capacidad para codificar información sobre la orientación de la cabeza en el entorno. Estas células son diferentes a las células de lugar y, aunque su localización neuroanatómica aún no se ha establecido definitivamente, se han encontrado en diversas regiones relacionadas con el procesamiento espacial, como la formación hipocampal, la corteza parietal posterior, el núcleo mamilar lateral, los núcleos talámicos anteriores, el núcleo talámico dorsolateral, la corteza retrosplenial y el estriado (Dudchenko *et al.*, 1997; Goodridge *et al.*, 1998)

La actividad de estas neuronas, que es independiente de la localización del animal en el entorno, se relaciona con la orientación de la cara del animal (Muller & Kubie, 1989. Taube, *et al.*, 1990). Una propiedad importante de estas células es que son capaces de mantener su actividad aun cuando las pistas ambientales se hayan eliminado; ello sugiere que las células direccionales, al igual que las células de lugar hipocampales, poseen memoria y no son activadas simplemente por la estimulación sensorial, sino que representan algunos aspectos del entorno.

Si bien el hipocampo no parece ser el almacén definitivo de contenidos de memoria bien establecidos, las evidencias clínicas y experimentales indican que el hipocampo cumple funciones importantes en la consolidación de la memoria (Milner, *et al.*, 1998). El hipocampo recibe de la corteza grandes volúmenes de información, la asocia, la retiene durante el procesamiento, la amplifica,

probablemente la compara con la ya existente y contribuye a su consolidación en la corteza cerebral (Malleret, *et al.*, 2001).

Los cambios a largo plazo en la eficiencia de la comunicación neuronal probablemente sean la base fisiológica del procesamiento de la información que recibe un individuo acerca de su entorno o experiencias vividas. (Noguès *et al.*, 1994). Uno de los eventos plásticos observados en el hipocampo y que se ha asociado con la memoria y el aprendizaje es la sinaptogénesis (Ramírez-Amaya *et al.*, 1999; 2001). En 1994, Moser *et al.*, encontraron que al entrenar animales adultos durante 18 días en un ambiente complejo, el cual estimula la conducta exploratoria, la densidad de las espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo se incremento significativamente. Además, si estos animales se sometían posteriormente al aprendizaje de una tarea espacial, eran más eficientes que aquellos que no se habían entrenado en el ambiente complejo, sugiriendo de esta manera la implicación funcional de los cambios morfológicos observados. Asimismo, se ha descrito un incremento en los contactos sinápticos de las fibras musgosas (FM) posterior a manipulaciones experimentales, tales como la inducción de epilepsia (Cavazos & Sutura, 1990), y de LTP *et al* (Escobar *et al.*, 1997). En este último trabajo sugiere que los cambios morfológicos en las terminales de las FM ocurrieron por la estimulación repetida con alta frecuencia de estas fibras y que, por lo tanto, podría ocurrir normalmente durante períodos de actividad reiterada de las células granulares en animales intactos (Escobar *et al.*, 1997, Wuarin *et al.*, 1996, Ben-Ari & Represa, 1990).

La LTP es propuesta como un mecanismo de almacenamiento de la información debido a las propiedades que presenta como lo es su especificidad, cooperatividad y la asociatividad. (Linden & Routtenberg, 1989).

Numerosos estudios han demostrado una correlación entre la LTP hipocampal y el aprendizaje y memoria (Barnes & McNaughton, 1985; McNaughton *et al.*, 1986; Laroche, 1991) así como una similitud entre muchos de los elementos que intervienen para que se produzca la LTP y aquellos empleados

en el aprendizaje, evidencias de esto son: 1) se puede provocar LTP con bajos niveles de estimulación que imitan la actividad nerviosa normal; 2) el condicionamiento de la conducta puede producir en el hipocampo cambios similares a la LTP; 3) muchos fármacos que influyen en el aprendizaje y la memoria tienen efectos paralelos sobre la LTP; y 4) la activación de receptores, cascadas de segundos mensajeros y la activación de proteínas cinasas (Kandel *et al.*, 2000). Dentro de las cinasas activadas encontramos a la proteína cinasa C (PKC), Klann *et al.*, (1993) observaron que su activación es necesaria para el mantenimiento del LTP ya que al bloquear esta proteína antes de la inducción de la LTP esta última presenta un decremento en su respuesta eléctrica. Pero no todas las cinasas implicadas en la LTP parecen ser activadas eficazmente por la vía de los receptores NMDA, por lo que se sugiere un posible papel cooperativo de otros neurotransmisores y sus respectivos receptores para el desarrollo y mantenimiento del LTP.

Se ha observado que la privación de aferencias colinérgicas en el hipocampo bloquea la LTP en el giro dentado (Bergado, *et al.*, 1996) y al transplantar tejido fetal de carácter colinérgico los animales se restaura la LTP (Bergado, *et al.*, 1997). Asimismo, la administración de agonistas muscarínicos es capaz de inducir una potenciación que se desarrolle lentamente, y mimetiza las fases tardías de esta (Auerbach, J & Segal, 1994; 1997). Por lo que se establece un actuar simultáneo en los mecanismos dependientes del receptor NMDA durante los procesos de plasticidad sináptica (Jerusalinsky, *et al.*, 1997).

Por otro lado, Shinoe *et al.*, en 2005, observaron que la inyección de agonistas colinérgicos a bajas concentraciones así como la liberación endógena de acetilcolina provocan un aumento en la respuesta eléctrica de LTP en CA1. Al medir la inhibición sináptica provocada por una alta concentración de carbacol (agonista muscarínico), encontraron que esta inhibición produjo un efecto menor en ratones carentes del receptor M_1 y $M_{1/3}$ no así, en aquellos carentes solamente de M_3 debido a que se comportan de manera similar al grupo control, así mismo al ser estimulado el stratum oriens con estímulos de alto voltaje se observó que la despolarización en los carentes de M_1 es mínima por lo que el porcentaje de LTP

es menor con respecto al control. Concluyendo que existe una participación diferencial de los receptores muscarínicos, modulando la plasticidad sináptica de CA1 a través de la activación los receptores postsinápticos M_1 .

Otro trabajo es el realizado por Rossi *et al.*, en 2004, donde observaron déficits en la memoria espacial en ratas adultas, dentro de sus resultados encontraron un menor acoplo de las proteínas G al receptor M_1 y la distribución de $PKC\gamma$ era mayor en la parte citosólica, contrario a lo visto en ratas jóvenes las cuales presentaban un mayor desempeño en el aprendizaje y su memoria; por lo que el deterioro de la memoria espacial en las ratas adultas está relacionado con la poca afinidad de las proteínas G a su receptor y la subsecuente disfuncionalidad en la traducción de señales iniciada en la sinapsis colinérgica.

1.4 Proteína Cinasa C (PKC).

La actividad de la proteína cinasa C (PKC) ha sido implicada como un mecanismo molecular para el aprendizaje y la memoria (Alkon, *et al.*, 2005). Esta proteína pertenece a una familia de cinasas de serina-treonina que son activadas por fosfolípidos ácidos, particularmente por fosfatidilserina, pero que poseen diferentes requerimientos de calcio, diacilglicerol y ésteres de forbol para su activación (Van Der Zee, *et al.*, 1997a). Esta familia es parte integral de la maquinaria de transducción de señales acopladas a receptores que inician una cascada de degradación de componentes lipídicos de membrana para controlar importantes procesos biológicos tales como apoptosis, memoria, diferenciación celular y tumorigénesis. El proceso de transducción inicia cuando el neurotransmisor se une a su receptor, este complejo cataliza el intercambio de GTP por GDP sobre una proteína G asociada, activándola. Esta proteína, activa a su vez una fosfolipasa C (PLC) en la membrana, la cual produce dos segundos mensajeros por hidrólisis del PIP_2 . Los productos de esta hidrólisis son el DAG y el IP_3 . El DAG activa directamente a la PKC. El segundo producto derivado de la acción de la PLC, el IP_3 , difunde de la membrana plasmática al retículo endoplasmático liso, en

donde se une a receptores específicos y causa la apertura de canales de calcio liberando el calcio secuestrado en el citosol. El aumento en las concentraciones de calcio junto con el DAG y la interacción de PKC con fosfolípidos ácidos hacen que la cinasa se encuentre en su estado “catalíticamente competente” en el cual puede fosforilar a sus sustratos específicos (Rendón & Robles, 2000)

1.4.1 Estructura molecular y mecanismos de activación.

Se han identificado 11 isoformas de esta proteína (PKC), las cuales están relacionadas entre sí, poseen diferencias en cuanto a su localización, especificidad de sustrato y propiedades cinéticas (Newton A. C. 1995). Estas isoformas están formadas por una sola cadena polipeptídica, dividida en dos dominios separados por la región hipervariable (también llamado bisagra): el dominio regulador (región amino-terminal) y el dominio catalítico (región carboxilo-terminal). Cada uno de estos dominios posee regiones altamente conservadas y variables (figura 3).

Las isoformas de PKC han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo a su estructura y a su regulación por cofactores: las convencionales (cPKC): α , β I, β II y γ , las cuales son reguladas por Diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y Ca^{+2} , las nuevas (nPKC): δ , ϵ , η , μ y θ , reguladas por DAG y PS y las atípicas (aPKC): λ y ζ cuya regulación no ha sido claramente establecida, aunque su actividad es estimulada por PS (Rendon & Robles, 2000).

El dominio regulador está constituido por una región auto-inhibidora de la enzima denominada la región pseudosustrato, esta región es la responsable de mantener a la enzima en su forma inactiva en ausencia de Ca^{+2} , DAG y fosfolípidos, y por una o dos regiones conservadas: la región C1 presente en todas las isoformas donde se lleva a cabo la unión del DAG y/o esteres de forbol alterando con ello los niveles de hidrofobicidad del dominio promoviendo interacciones con la membrana celular, y la región C2 presente sólo en las convencionales y nuevas (Newton A. C. 1995).

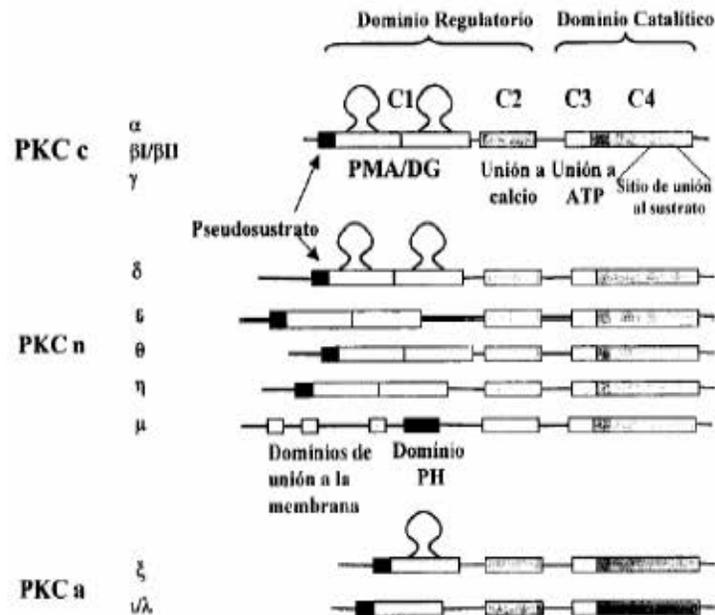


Figura 3.- Estructura primaria de las diferentes subfamilias de proteína cinasa C. Se muestran la región pseudosustrato, las regiones altamente conservadas (C1-C4) las cuales constituyen los dominios regulatorios y región bisagra. Tomado de Rendon & Robles, 2000.

El dominio catalítico está constituido por las regiones C3 y C4. La región C3 contiene una secuencia de unión a ATP y un residuo de lisina mientras que la región C4 está constituida por grupos de secuencias únicas en las isoformas de PKC y constituyen la llamada "asa de activación". Su presencia es crucial para el reconocimiento del sustrato proteico y participa en la transferencia del grupo fosfato (Newton A. C. 1995).

La activación de PKC está regulada por dos mecanismos distintos e igualmente importantes: en el primero, la enzima alcanza un estado denominado "catalíticamente competente" por medio de fosforilaciones que alinean correctamente a los residuos para su catálisis, y en el segundo se lleva a cabo la unión de moduladores positivos (como el Ca^{+2} , el DAG y la PS) provocando la remoción de la región pseudosustrato del sitio de unión al sustrato.

Las isoformas de PKC inactivas se encuentran principalmente en el citosol mientras que sus activadores, los cuales tienen un carácter hidrofóbico, están presentes en la membrana. Cuando PKC está en su forma activa, se encuentra asociada a la membrana plasmática, elementos del cito-esqueleto, núcleo y otros componentes subcelulares (Mochly, *et al.*, 1990). (Figura 4)

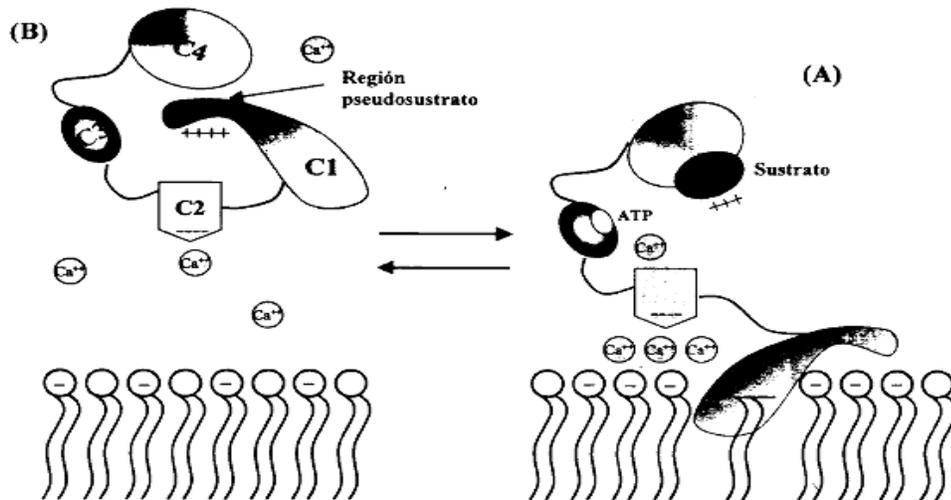


Figura 4.- Modelo de la conformación activa (A) e inactiva (B) de PKC. En la conformación inactiva, la región pseudosustrato de PKC se encuentra interactuando con la región de unión a sustrato (región C4). Después de ser fosforilada PKC en el asa de activación y el extremo carboxilo, la aparición de los cofactores específicos promueven la liberación de la región pseudosustrato permitiendo la interacción de la región C1 con la membrana y fosforilación de los sustratos correspondientes. (Tomado de Rendon & Robles, 2000.)

La localización de PKC en diferentes compartimientos celulares ha conducido a establecer interacciones proteína-proteína, se han identificado tres grupos de proteínas que pueden interactuar *et al* con PKC. Un grupo son las proteínas que se unen a la PKC a través de un puente de fosfatidilserina y en algunos casos no requieren de la activación completa de PKC para su unión (Mochly-Rosen & Gordon, 1998). Estas proteínas son sustratos de PKC, ejemplos de éstas son: MARCKS (sustratos de cinasa C ricos en alanina miristoilada), AKAP (proteínas de anclaje a cinasas dependientes de AMPc). Un segundo grupo son las llamadas RACKs (receptores a cinasa C activas). Estas proteínas se unen solamente a la forma activa de PKC siendo esta unión específica. Un tercer grupo de proteínas que también interactúan con PKC son las llamadas RICKs (receptores para la cinasa C inactiva). Estas cinasas fueron de las primeras proteínas de señalización en las que se observó el fenómeno de la translocación (redistribución) a nuevos sitios subcelulares como resultado de su activación, un claro ejemplo de esto se ha visto en el hipocampo después de diferentes tipos de tareas (Olds *et al.*, 1990).

1.5 Vesículas sinápticas en las terminales nerviosas.

La transmisión sináptica en las terminales nerviosas comienza con la llegada de un potencial de acción que dispara la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. La entrada de Ca^{2+} conlleva a la exocitosis de las vesículas sinápticas (VS's) y se produce la liberación de los neurotransmisores a la hendidura sináptica (Kuffler *et al.*, 1984). Tras la liberación, las vesículas sinápticas se reciclan mediante diferentes tipos de endocitosis, se vuelven a cargar de neurotransmisores y quedan listas para un nuevo ciclo. Las VS's funcionan como micromáquinas especializadas en la liberación de neurotransmisores y las proteínas vesiculares participan en múltiples funciones del tráfico vesicular, como la fusión de membranas regulada por Ca^{2+} o la endocitosis (Almers & Tse, 1990). La actividad sináptica mantenida, requiere ciclos continuos de exo- y endocitosis, que probablemente contribuyan al desgaste funcional o pérdida de la conformación nativa de las proteínas presinápticas que participan activamente en este proceso. No obstante, las terminales sinápticas mantienen la actividad y la integridad sináptica durante muchos años (Trimble & Scheller, 1988).

Existen VS's que no se encuentran en los sitios activos, están agrupadas en el citoplasma presináptico, unidas entre sí o a la actina, gracias a una proteína, la sinapsina I, ubicada en la membrana de las vesículas. Cuando esta proteína es fosforilada se despegan las vesículas de los filamentos o de las otras vesículas. La fosforilación es catalizada por CaMK-II, iniciando el proceso de movilización vesicular (Valtorta *et al.*, 1992).

La colocación de las VS's se produce por un complicado proceso en el que interactúan proteínas de la pared de la vesícula (sinaptobrevina y sinaptotagmina) y de la membrana de la terminal (sintaxina y SNAP-25). Algunos de estos componentes se unen para formar un complejo llamado SNARE (sintaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina) que interactúa en el proceso de la ubicación con dos proteínas solubles: NSF (factor sensible a n-etilmaleimida) y α -SNAP, que es una

proteína de unión a NSF, necesaria para que esta molécula (NSF) exprese su actividad de ATP-asa. (Walworth *et al.*, 1989)

La ubicación de la vesículas en el sitio activo se explica, entonces, por la llamada hipótesis SNARE. Se asume que existe el complejo SNARE que al estar unido a la sinaptotagmina forma un complejo mayor que une a la vesícula a un punto de la membrana. En esta situación, existe en la membrana vesicular una GTP-asa (hidroliza GTP) llamada Rab-3. Al hidrolizarse el GTP por la acción de esta enzima, el GDP resultante, se une a una proteína de la membrana plasmática (n-sec 1), fenómeno que permite la fusión de ambas membranas. Pero este fenómeno de fusión se iniciaría por la unión del calcio a la sinaptotagmina del complejo. Si no hay complejo SNARE la entrada del calcio no produciría la fusión. (Op cit. en Valtorta, *et al.*, 2004).

En experimentos de registro de capacitancia durante la exocitosis se observa la aparición transitoria y reversible de un poro, que tiene la conductancia de un canal iónico (Monck & Fernández. 1992). La formación transitoria de este poro de fusión se ha observado en muchas células secretoras y se piensa que es un fenómeno común en la fusión de las membranas biológicas que tienen lugar durante la exocitosis, se han implicado varias proteínas de las VS's en la formación de este poro así como en la interacción de la membrana vesicular y la plasmática, destacando la sinaptotagmina, sinaptobrevina y sinaptofisina.

1.5.1 Sinaptofisina.

La sinaptofisina (Syp, por sus siglas en inglés, *et al*), es una glicoproteína, la cual presenta un peso de 38 kDa y constituye del 6 al 8 % del total proteico de las VS's. Fue la primera proteína integral de membrana en ser aislada, contiene cuatro regiones transmembranales y una terminal carboxilo que consiste en diez pentapéptidos repetidos, nueve de los cuales son iniciados por un residuo de tirosina, sugiriendo que puede ser blanco de cinasas de tirosina y que dicha fosforilación podría ser central para su función (Evans & Cousin, 2005).

Esta proteína, una vez reconstituida en lípidos de membrana, exhibe propiedades de un canal iónico (Thomas *et al.*, 1988), lo cual ha llevado a sugerir que podría formar parte del poro de fusión formando un complejo junto con las proteínas que participan en la unión de las vesículas a la zona activa de la membrana plasmática. Estudios en sinaptogénesis han demostrado altos niveles de expresión de Syp durante este proceso además de ser una de las proteínas sinápticas más tempranas en acumularse durante la formación de sinapsis en medios de cultivo (Fletcher *et al.*, 1991).

II. ANTECEDENTES

La memoria espacial está muy relacionada con la actividad del hipocampo, diversos estudios han demostrado que durante la realización de tareas espaciales, el hipocampo presenta una alta actividad (Morris et. al., 1986, 1990, Sutherland & Rodriguez, 1989, Maguire et. al., 1998), así como conjuntos de células especializadas en la codificación de la orientación, sosteniendo la idea de que el hipocampo es crucial en la representación del espacio y la realización adecuada de tareas espaciales (O'Keefe & Nadel 1978; Wiener 1989; Nadel 1989).

Por otro lado, tanto el aprendizaje como la memoria se han asociado a eventos plásticos los cuales se pueden ver como cambios estructurales y funcionales en las sinapsis (Sherrington, 1983; Kandel, 1992; Bennett, 2000, Lamprecht & LeDoux, 2004). Ejemplo de ello es el trabajo realizado por Ramírez-Amaya *et al.*, 1999 quienes observaron que ratas sobreentrenadas en una tarea espacial presentaban un incremento en la densidad de las terminales sinápticas de las fibras musgosas en la región del estratum oriens en CA3, en comparación con las de control de nado, a las cuales sólo se les permitió el libre nado por un tiempo determinado, apoyando la idea de que este cambio estructural en las terminales sinápticas es debido al aprendizaje. Más tarde se confirmó que este cambio era consecuencia del aprendizaje y su memoria utilizando un antagonista de los receptores tipo NMDA el cual bloqueó la sinaptogénesis en el estratum oriens y el aprendizaje al ser inyectado antes del entrenamiento mientras que posterior al entrenamiento no tuvo ningún efecto en el aprendizaje o en la sinaptogénesis siendo esta última similar al grupo entrenado durante 5 días. Por lo que apoya la idea de que el hipocampo es una estructura crucial en el aprendizaje y memoria de una tarea espacial así como que los cambios estructurales en esta zona son consecuencia del aprendizaje y la memoria que resulta de éste (Ramírez-Amaya *et al.*, 2001).

Dentro de los sistemas de neurotransmisión mayormente estudiados en el hipocampo encontramos el glutamatérgico, el cual se ha visto asociado a eventos plásticos (Bashir, *et al.*, 1991; Asztely & Gustafson, 1996; Bici & Kiss, 1998.) y el colinérgico. Este último se ha visto involucrado en varios procesos de plasticidad sináptica como son el aprendizaje y memoria.

En nuestro laboratorio el sistema de neurotransmisión colinérgico ha sido ampliamente estudiado y se ha observado que está implicado en diferentes tipos de aprendizaje como el gustativo (Gutiérrez 2003; Ramírez-Lugo 2001) y el espacial (Herrera- Morales *et. al.*, 2007). En el trabajo de Herrera-Morales *et. al.*, realizaron manipulaciones farmacológicas en el área de CA3 del hipocampo mediante un antagonista no selectivo de receptores muscarínicos (escopolamina) y reportan que dicha manipulación farmacológica impide totalmente el aprendizaje de una tarea espacial; posteriormente muestran una participación diferenciada de los receptores muscarínicos pre y post sinápticos, durante la adquisición y consolidación de la tarea, reportando al receptor postsináptico M₁ como mediador de la consolidación más no de la adquisición de esta tarea espacial.

El reciente estudio de PKC le han atribuido importantes funciones en el desarrollo neuronal, la modulación de canales iónicos, la liberación de neurotransmisores, en los fenómenos de plasticidad sináptica (Tanaka & Nishizuka, 1994) y el aprendizaje (Van Der Zee, *et al.*, 1997b)

Farley & Auerbach, en 1986 utilizando como modelo experimental las células B de *Hermisenda*, en las cuales se encuentra una gran cantidad de PKC, observaron que al inducir la activación de PKC se producía una reducción en el flujo de K⁺ similar a la ocurrida en un aprendizaje asociativo. Posteriormente Alkon *et al.*, (1988) estudiaron el aprendizaje asociativo en *Hermisenda*, para comprobar lo antes observado, este consistía en un disparo de luz en los ojos de este molusco seguido de una turbulencia. Después de aprendida la tarea observaron una disminución en el flujo de K⁺, asociándola a la activación de PKC, así como un aumento en la síntesis de proteínas requerida para el establecimiento de una memoria a largo plazo, ya que al inducir una activación de PKC por medio de

Briostantina (Bryo) obtuvieron el establecimiento de una memoria a largo plazo en menor tiempo, por el contrario, al inactivar PKC la síntesis de proteínas se disminuyó y la consolidación de la MLP se vio deteriorada.

Por otro lado De Riemer, *et al.*, (1985), observaron que la activación endógena de PKC por medio de la inyección de forbol o la administración de PKC purificada aumentó la excitabilidad de las neuronas y con ello produjo un mayor flujo de calcio en neuronas del modelo de *Aplysia* proporcionando un mantenimiento mayor de la LTP. Más tarde Sacktor y Schwartz en 1990, demostraron en *Aplysia* que la sensibilización a corto plazo induce el desplazamiento de PKC del citosol a la membrana en neuronas sensoriales mostrando un aumento de su actividad y la facilitación del aprendizaje llevando al establecimiento de una memoria a largo plazo.

Relacionado al aprendizaje espacial también se han visto cambios en la actividad de PKC, ejemplo de ello es el trabajo de Noguès *et al.*, (1994), quienes observaron que posterior a una tarea espacial, en este caso un laberinto radial, la inmunoreactividad a PKC en el citosol se vio disminuida. En trabajos posteriores observaron que individuos tratados con Poliximina B (PMB, inhibidor de PKC) en CA1 antes de la tarea espacial, presentaron deficiencias en el aprendizaje al compararlos con el control mientras que su memoria a largo plazo presento una atenuación en la consolidación de la memoria mostrando una retención similar al grupo control (Noguès *et al.*, 1996).

Se ha observado que en ratas adultas la inmunoreactividad de PKC es mayor en la parte citosólica que en la de membrana plasmática sugiriendo que la actividad de PKC disminuye en membrana, a diferencia de ratas jóvenes las cuales presentan una mayor cantidad de inmunoreactividad en la membrana por lo que esta disminución está asociada al déficit presentado para el establecimiento de una memoria espacial correlacionada con la edad (Colombo & Gallagher, 2002).

Se sabe que PKC ejerce una potente acción facilitadora sobre la transmisión sináptica, efecto que ha sido descrito tanto en rebanadas de tejido cerebral (Francis *et al.*, 2002), como en preparaciones de sinaptosomas (Coffey *et al.*, 1993) y cultivos neuronales (Kudoh *et al.*, 2001).

Además de canales iónicos, PKC fosforila múltiples proteínas de la maquinaria exocitótica como GAP-43, MARCKS, 14-3-3, dinamina I, VAMP y SNAP-25 (Betz *et al.*, 1998; Genoud *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2000; Hepp *et al.*, 2002). La fosforilación de estas proteínas se ha relacionado con un incremento en la movilización de vesículas desde el compartimento de reserva hacia la zona activa (Waters & Smith, 2000), con un aumento de la sensibilidad de la maquinaria exocitótica al Ca^{2+} (Wu & Wu, 2001) y, en el caso de dinamina I, con una facilitación del reciclaje de las vesículas tras la exocitosis (Cousin *et al.*, 2001).

Por otro lado, la posible función de la sinaptofisina en la liberación de neurotransmisores dependientes de Ca^{2+} se ha estudiado en ovocitos de *Et al.*, Alder *et al.*, en 1992, demostraron que la microinyección de RNA mensajero del cerebro de la rata que codifica para esta proteína, lleva a la aparición de liberación de glutamato o acetilcolina dependiente de Ca^{2+} , mientras que la microinyección de oligonucleótidos antisinaptofisina ó anticuerpos contra esta proteína resulta en una reducción de la liberación de NT's dependiente de Ca^{2+} . Estos datos se han interpretado en el sentido de que la sinaptofisina es una proteína esencial para el ensamblaje en el ovocito de un aparato exocitótico, similar al neuronal. Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de Syp tiene como resultado un fuerte incremento en la frecuencia, pero no en la amplitud de las corrientes sinápticas espontáneas, sugiriendo un papel funcional en la excitación de la neurona (Op. cit en Valtorta, *et al.*, 2004).

Sin embargo, la función de la sinaptofisina aún no está definida ya que se ha observado que ratones carentes de la expresión de sinaptofisina, no presentan ninguna anomalía estructural ni en la línea basal de su transmisión sináptica, por lo que se dice que la función de esta proteína puede ser redundante o apoyada por alguna otra (McMahon *et al.*, 1993).

Como ya se mencionó, PKC está ampliamente distribuida en el Hipocampo lo cual le confiere posiblemente un papel importante en el funcionamiento del mismo en relación al procesamiento de la información, se ha observado que su inactivación en el área CA1 tiene repercusiones en el aprendizaje espacial. Por otro lado, sabemos que el área de CA3 es importante en la organización y procesamiento de la información que llega al hipocampo durante la realización de una tarea espacial, pero no su relación con la actividad de PKC, por lo que las preguntas experimentales de esta tesis van dirigidas a ¿cuál es la participación de PKC en CA3 en el aprendizaje y/o consolidación de una tarea espacial, y la expresión de sinaptofisina en esta área tiene relación con la consolidación de esta memoria?

III. HIPÓTESIS

1. La PKC es indispensable en el área CA3 del hipocampo para formar una memoria de largo plazo.
2. El proceso de consolidación de una tarea espacial está asociado a la sinaptogénesis en la región de CA3 del hipocampo.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar el papel de PKC en la región CA3 del hipocampo durante el aprendizaje y/o consolidación de una tarea espacial.

PARTICULARES

1. Evaluar el aprendizaje de una tarea tipo declarativa en animales tratados con Queleritina (inhibidor de PKC) en el área CA3 del hipocampo.
2. Evaluar la memoria de largo plazo de una tarea espacial (declarativa) en animales tratados con Queleritina en CA3.
3. Analizar mediante western blot la expresión de sinaptofisina en el área de CA3 en los grupos tratados con Queleritina o control en CA3.

V. MATERIAL Y MÉTODO.

Para determinar el papel de PKC en la región de CA3 del hipocampo en el aprendizaje y/o consolidación de una tarea espacial, se inyectó un inhibidor de PKC (Quelerritina) en dicha región antes del entrenamiento en el paradigma conductual del laberinto acuático de Morris, descrito posteriormente.

Para determinar la expresión de sinaptofisina se plantearon los grupos indicados en el cuadro 1, cada grupo recibió inyecciones de Quelerritina o Vehículo en el área de CA3 del hipocampo dependiendo al grupo que pertenecían y fueron sacrificados al termino del entrenamiento..

Tratamiento	Entrenamiento
Control	1 día 4 días 11 días
Quelerritina	1 día 4 días 11 días

Cuadro 1.

5.1 Animales.

Cincuenta ratas wistar macho de un peso aproximado de 300 gr. al momento del inicio del experimento, fueron colocadas en cajas individuales, permanecieron en condiciones constantes de luz-oscuridad en ciclo invertido de 12-12 horas (inicio de oscuridad 07:00 hrs.), temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, los animales tenían acceso libre al consumo de comida y agua durante todo el experimento. Todos los métodos se utilizaron según las reglas de salud del Secretaria de Salud de México y aprobados por el comité local de cuidado y uso animal.

Todos los experimentos conductuales se realizaron durante la fase oscura del ciclo luz-oscuridad.

5.2 Cirugía estereotáxica.

Se realizó el implante de cánulas de acero inoxidable de 9 mm de manera bilateral en el cerebro de los animales por medio de un aparato esterotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA) bajo anestesia (80 mg/Kg i.p. de clorhidrato de Ketamina y 12mg/Kg i.p. de Xilacina).

El extremo inferior de las cánulas fue implantado 1.5 mm por encima de la región CA3 del hipocampo (AP=-3 L=±3.4 DV=-1.5 respecto a bregma, Paxinos & Watson, 1987). Las cánulas fueron fijadas con cemento acrílico dental y dos tornillos de acero inoxidable. Finalmente se colocó un obturador metálico para mantener el buen estado del implante durante el experimento.

5.3 Manipulación.

Los animales tuvieron un periodo de recuperación post-operatorio en el cual fueron manipuladas para su mejor manejo durante el experimento. La manipulación consistió en sujetarlas y envolverlas con una franela dejando descubierta la cabeza, el tiempo de manipulación dependía de cada animal hasta que se habituara al contacto humano, y nunca excedió los 2 minutos.

5.4 Tratamiento.

Al término de la manipulación los animales fueron divididos al azar en 2 grupos cada uno de 20 individuos. El primer grupo se asignó como el experimental, el cual fue sometido a microinyecciones bilaterales en CA3 de 0.5 µL de Queleritina (10mM queleritina, Sigma), un inhibidor de PKC y el segundo

grupo (control) se le administró 0.5 μ L de Vehículo (agua bidestilada). Las microinyecciones se hicieron en un tiempo de 2 minutos y la aguja se dejó dentro de la cánula durante 2 minutos más para permitir una correcta difusión. Cada microinyección fue realizada 20 minutos antes del entrenamiento, siendo un total de 4 microinyecciones por individuo.

5.5 Paradigma conductual.

Los animales fueron entrenados en el Laberinto Acuático de Morris, el cual consiste en una piscina circular de 132 centímetros de diámetro y 53 centímetros de altura, de paredes y piso negro. Llena de agua a 19 °C y con una plataforma de escape sumergida 1 centímetro debajo del nivel del agua, situada en el centro de uno de los cuadrantes del tanque durante todo el entrenamiento.

El entrenamiento consistió de 4 días, cada uno con 10 ensayos. Cada animal fue colocado en el laberinto al término de los 20 minutos después de la microinyección, partiendo de un punto diferente de la piscina en cada ensayo. El tiempo total de cada ensayo es de 60 seg., si el animal encontraba la plataforma antes de los 60 seg. se detenía el tiempo y se dejaba en la misma por 30 seg., pasado ese tiempo era colocada en una caja durante 30 seg. más y posteriormente se continuaba con el siguiente ensayo hasta cubrir 10 ensayos. Si el animal no encontraba la plataforma en los 60 seg. se colocaba en ella al término del tiempo, siguiendo el protocolo anterior. Al término del entrenamiento los animales eran regresados a sus cajas (ver detalles, Nerad, Ramirez-Amaya *et al.* 1996)

Cada entrenamiento fue grabado mediante un sistema Cromotrack (San Diego Instruments) permitiendo obtener datos del recorrido como la latencia (tiempo que tarda en llegar a la plataforma), la distancia recorrida y la permanencia en cada cuadrante del laberinto.

Después de terminados los 4 días de entrenamiento los animales permanecieron en sus cajas en el bioterio durante 7 días, pasado este tiempo se realizó la evaluación de la memoria a largo plazo, la cual consiste en un solo ensayo con duración de 120 seg. teniendo como punto de partida la misma posición de uno de los ensayos para todos los animales, así como el retiro de la plataforma de la piscina. Durante este tiempo se midió la latencia de llegada al lugar donde se encontraba la plataforma durante el entrenamiento, así como el número de veces que el animal pasa por este lugar, esta variable se denomina número de cruces y el tiempo que los animales permanecen en cada cuadrante de la piscina es denominado "Dwell"; medido sólo durante los primeros 30 seg. al iniciar la prueba, el cuadrante donde se localizaba la plataforma se determinó como blanco, a partir de este se derivan el adyacente, adyacente' y el opuesto (ver figura 5).



Figura 5.- Localización de los cuadrantes dentro del laberinto

5.6 Histología.

Al siguiente día de finalizado el experimento los animales fueron perfundidos con solución salina al 0.9% transcárdialmente para limpiar el cerebro de sangre y posteriormente se utilizó una solución de paraformaldehido (4% en buffer de fosfatos 0.1 M) como fijador del tejido. Se extrajeron los cerebros y se colocaron en frascos individuales con paraformaldehido. Posteriormente fueron

cambiados a una solución de sacarosa al 15% permaneciendo ahí hasta que se asentaran en el fondo del frasco, pasado ese tiempo se colocaron en una solución de sacarosa al 30%. Posteriormente se realizaron cortes coronales del tejido en la parte del hipocampo dorsal, los cortes se realizaron mediante un criostato y cada corte era de 40 μ m, los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo para examinar la ubicación de las cánulas.

Cada corte fue revisado en el microscopio con el objetivo 10X para corroborar que la microinyección se realizara en CA3, se tomaron fotografías de la ubicación de las cánulas.

5.7 Homogenización.

Para la realización del Western Blot se entrenaron dos grupos de ratas, las que fueron decapitadas al término de su entrenamiento o prueba de MLP (1 día, 4 días y 11 días) se les extrajo la región de CA3 y GD del hipocampo. El tejido fue colocado en buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium desoxycholate, 1 tableta de inhibidor de proteasas, ROCHE), homogenizado por medio de un sonicador, Branson Sonifier 250 y congelado a -72 °C.

5.8 Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante el método de Lowry (Kit BIO-RAD), midiendo cada muestra por cuadruplicado.

5.9 Western Blot.

Se diluyeron 30 μ g de homogenado de cada muestra a 1:1 en solución Laemli buffer con 5% de β -mercaptoethanol y se hirvieron durante 5 minutos.

Se cargaron las muestras en geles de acrilamida 12% (gel separador a pH 8.8 al 12%, Tris 37.29 mM pH 8.8, SDS 3.4mM, Acrilamida 70mM, 5 µl de TEMED y APS 21.79 mM; y gel concentrador a pH 6.8 al 4.5%, Tris pH 6.8 0.12 mM, SDS 51 mM, Acrilamida 32 mM, 5 µl de TEMED y APS 6.4 mM).

Se montaron los geles en una cámara de Western Blot (BIO-RAD Minni PROTEAN 3 cell) el gel de acrilamida 12% está formado por 10 carriles: un carril para el marcador de peso molecular, 6 para las muestras y uno para el homogenado total. Una vez cargadas las muestras, la cámara fue conectada a un regulador Power Pac 200 de BIO-RAD a 180 V por 90 minutos a temperatura ambiente, en buffer de corrida (Tris Base 25 mM, Glicina 0.19 M, SDS 2.88 M).

Las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana PVDF (Bio-Rad); las membranas y los geles se equilibraron en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 0.19 M, SDS 2.88 M y Metanol 20%) por 20 minutos. En la cámara de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cel); se conectó la cámara a un regulador a 25 V por 40 minutos. Terminada la transferencia se colocó la membrana en BSA al 5% diluido en TBS-T (Tris base 9.9 mM, NaCl 0.15 M, y Tween al 0.1%) y se dejó toda la noche a 4°C.

Las membranas se colocaron en anticuerpo primario (Synaptofisina, SIGMA, 1.3:20,000) disuelto en TBS-T con BSA al 1% por hora y media a temperatura ambiente y agitación constante. Al terminar se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T. Posterior a los lavados se colocó el anticuerpo secundario (anti-mouse, Zygmond 1:3,000) disuelto de la misma forma durante una hora y media a temperatura ambiente y agitación constante. Al término de este tiempo se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T. Finalmente las membranas fueron colocadas en una solución de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate de PIERCE). Las membranas fueron reveladas en placa reveladora Kodak BioMax MR Film, Scientific imaging film.

5.10 Análisis de imágenes

Las placas fotográficas fueron digitalizadas y las densidades de píxeles fue determinada por medio del programa Image J.

5.11 Análisis Estadístico

Para determinar la diferencia estadística entre los grupos durante el entrenamiento y en la densitometría se usó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas, para pruebas de memoria a largo plazo se realizó por medio de una ANOVA de una vía. Para determinar diferencias entre los tratamientos fue utilizado el análisis post-hoc de Fisher.

VI. RESULTADOS

6.1 Verificación de la implantación de la cánula.

El examen histológico mostró que el inyector fue situado correctamente en el área CA3 del hipocampo (figura 6). Dos ratas del grupo control fueron excluidas del experimento debido a que la implantación de las cánulas se encontraban fuera del área de CA3.

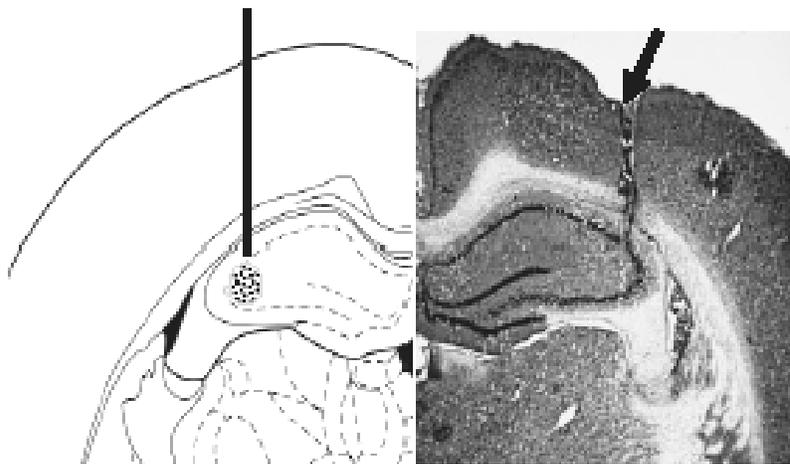


Figura 6.- Corte histológico del hipocampo e implantación de la cánula. En el lado derecho se muestra un corte coronal del hipocampo, la flecha indica el lugar de implantación de la cánula. En el lado izquierdo se muestra un mapa del hipocampo, la zona punteada indica el área de CA3 donde se realizaron las microinyecciones.

6.2 Efecto del inhibidor de PKC en el aprendizaje de una tarea espacial.

Como se muestra en la figura 7, el análisis de varianza (ANOVA) de medias repetidas mostró diferencias entre ambos grupos en el ensayo 10 durante los días 1 y 2 ($F_{1,86} = 9.141, 5.96; p < 0.05$), esta diferencia se pierde para los días 3 y 4 mostrando un aprendizaje similar. Indicando que la microinyección de queleritrina en el área de CA3 antes del entrenamiento no afecta la adquisición de la tarea espacial.

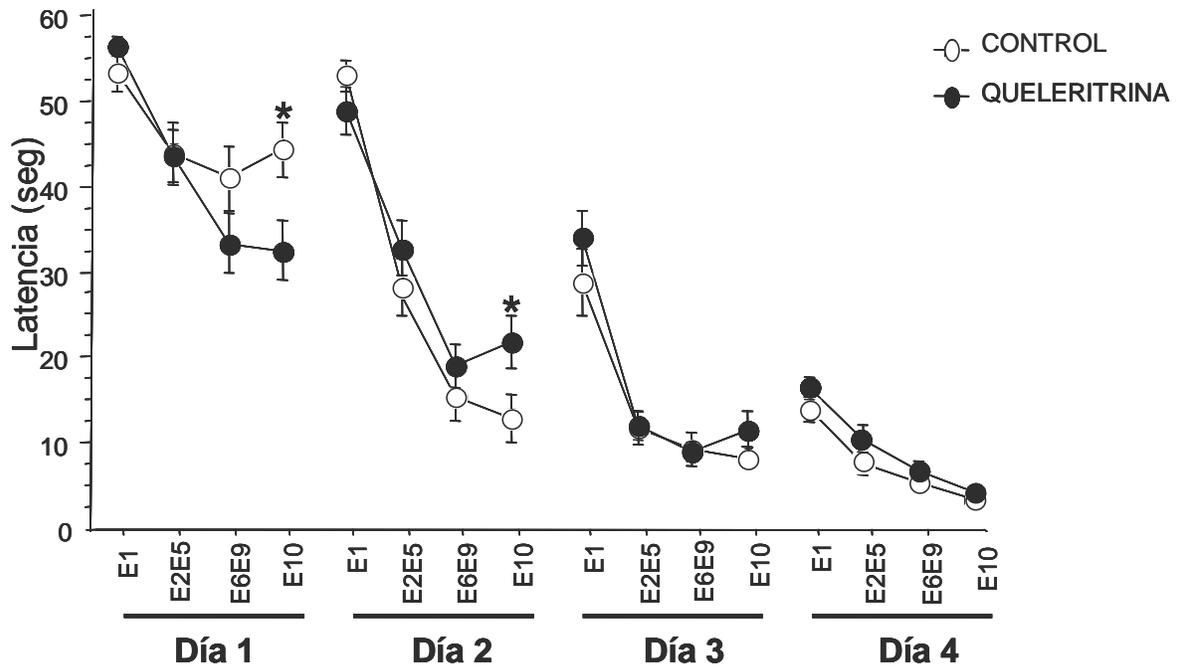


Figura 7.- Curva de aprendizaje. En el eje de las "Y" se muestra la latencia de llegada a la plataforma, medida en segundos durante el aprendizaje. En el eje de las "X" se muestra cada uno de los 4 días de entrenamiento, en cada día se representan 4 puntos el 1^{er} y 10^o ensayo así como el promedio de los ensayos 2 al 5 y 6 al 9. * = $p < 0.05$

6.2.1 Efecto del inhibidor de PKC en la MLP de una tarea espacial.

Como lo muestra la figura 8, durante la medición de la memoria a largo plazo el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía arrojó diferencias significativas entre ambos grupos en la latencia ($F_{1, 20} = 7.066$; $p < 0.05$) y el número de cruces en el lugar donde se ubicaba la plataforma durante el entrenamiento ($F_{1, 20} = 8.25$; $p < 0.05$). Los datos obtenidos nos muestran que el tratamiento empleado produce un efecto amnésico en el grupo de animales que fue sometido a microinyecciones de queleritrina antes del entrenamiento.

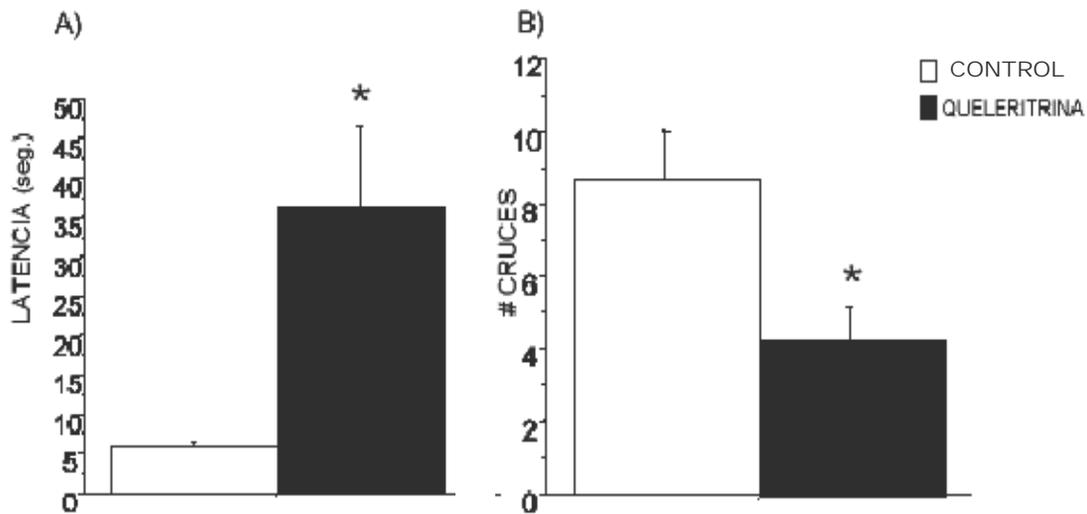


Figura 8.- Memoria a largo plazo. A) En el eje de las “Y” se muestra la latencia medida en segundos del grupo de queleritrina y del grupo control durante la prueba (7 días posteriores al entrenamiento). B) En el eje de las “Y” se muestra el número de cruces realizados en el sitio donde se ubicaba la plataforma durante el entrenamiento. *= $p < 0.05$

Otra medida realizada fue el “Dwell”, el cual se refiere a la permanencia del animal en cada cuadrante del laberinto. El análisis de varianza (ANOVA) realizada a este parámetro, mostró diferencias significativas entre ambos grupos ($F_{7, 72} = 5.586$; $p < 0.001$) y la prueba post-hoc de Fisher mostró diferencia significativa el grupo de queleritrina y el control en el cuadrante blanco ($p < 0.01$). Como se muestra en la figura 9, la permanencia del grupo de queleritrina en el cuadrante blanco (lugar donde se ubicaba la plataforma) es menor al del grupo control asimismo no presenta preferencia alguna por algún cuadrante. Lo que nos indica que la administración de queleritrina antes del entrenamiento produce un déficit en el establecimiento de la memoria espacial a largo plazo.

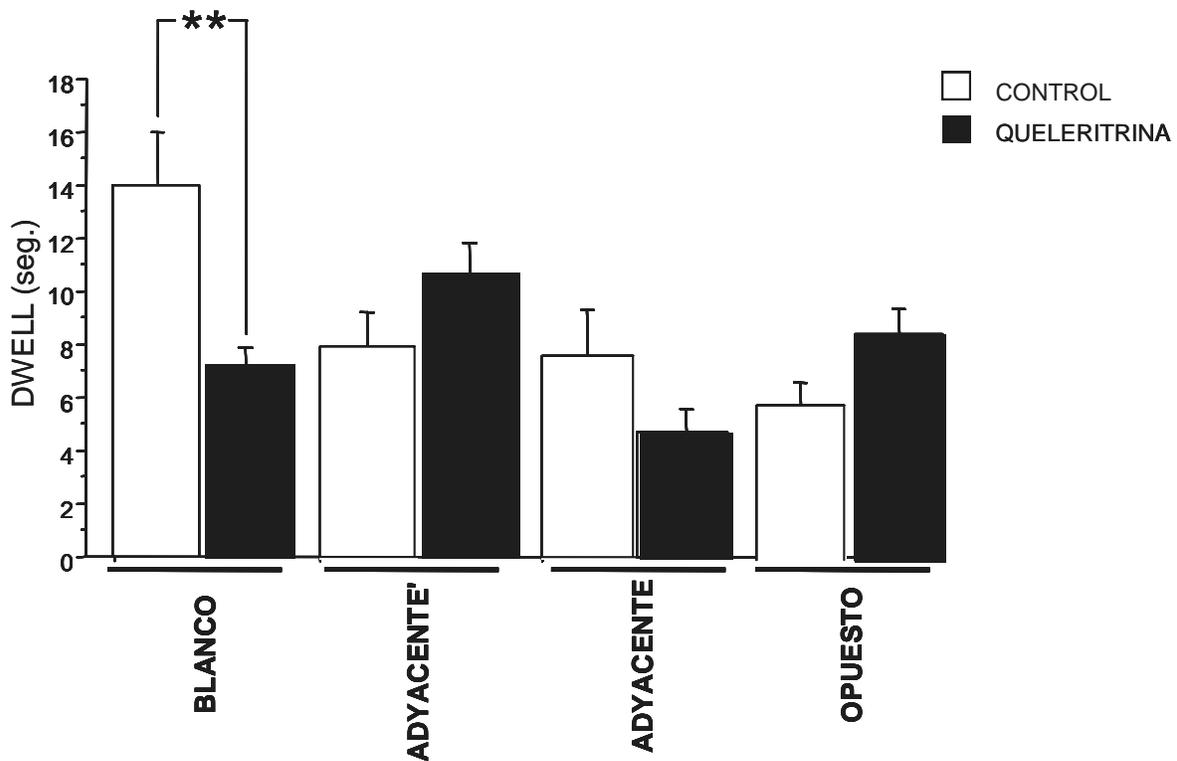


Figura 9. Dwell. En el eje de las "Y" se muestra el Dwell del grupo control y del grupo de queleritina, este fue medido durante los primeros 30 seg. de la prueba. En el eje de las "X" se muestra cada uno de los cuadrantes. **= $p < 0.01$

Este déficit es parecido al obtenido por Ramírez-Amaya, *et al.* 2001; al antagonizar los receptores glutamatérgicos tipo NMDA por medio de APV, mostrando un efecto amnésico en la MLP y en la disminución de la densidad de fibras musgosas en la región SO en el área de CA3. Para determinar si este cambio en la densidad de las fibras musgosas en esta región tiene relación con la adquisición y/o consolidación de una memoria espacial, se cuantificó la cantidad de Syp en dicha área, se sabe que esta glicoproteína se encuentra altamente relacionada con el ciclo de vida de VS's, siendo mas relevante su presumible participación en la liberación de neurotransmisores (Valtorta, *et al.*, 2004). Por lo que se realizó el siguiente experimento en donde se entrenaron 4 grupos de ratas intactas ($n=2$ en cada uno), los cuales fueron divididos de la siguiente manera; Entrenadas 1 día y 4 días, y Control de nado 1 día y 4 días; cuya finalidad es cubrir las mismas características en las que se desenvuelven las ratas entrenadas pero sin claves espaciales, por lo que no son capaces de adquirir la tarea. Posteriormente se realizo un Western Blot a las muestras obtenidas de cada grupo.

6.3 Cambio en la cantidad de Syp en el área de CA3 en ratas entrenadas y control de nado.

El análisis de varianza (ANOVA) realizado a los grupos no muestra diferencia significativa entre los mismos (n=2). Aún así, como se observa en la figura 10, existe una tendencia a incrementarse la cantidad de Syp al transcurrir los días del entrenamiento o el control de nado, este aumento es mayor en los animales entrenados que en aquellos que se les permitió el libre nado. Al analizar el área del GD este incremento no fue observado. Por lo que esta técnica nos permite hacer inferencia en la funcionalidad de las nuevas sinapsis observadas por Ramírez-Amaya, *et al.*, (1999) en el SO de CA3.

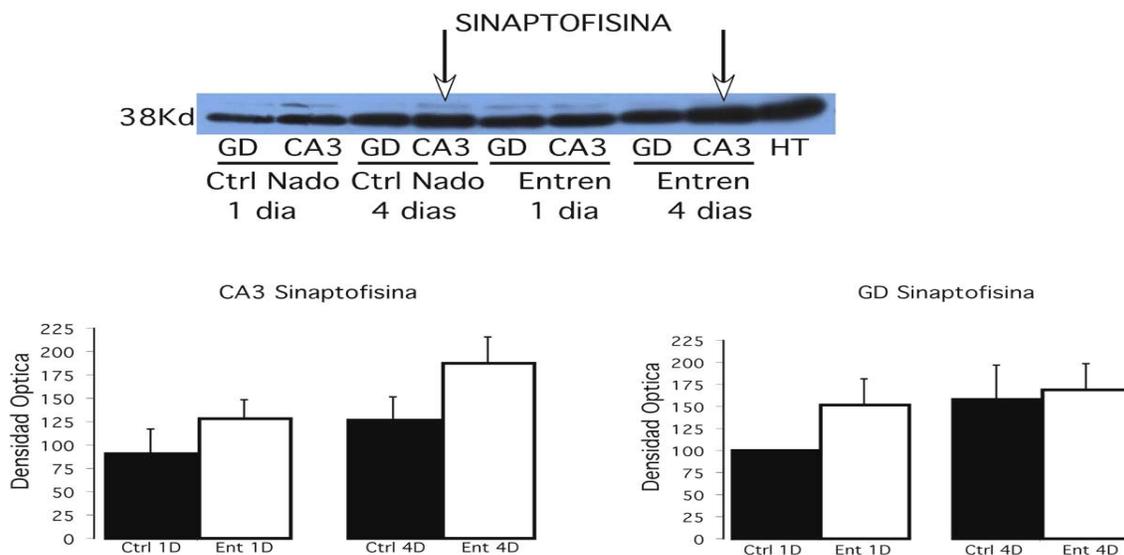


Figura 10. Efecto del sobreentrenamiento espacial sobre la cantidad de sinaptofisina en CA3 y GD. A) Blot representativo. B) Sinaptofisina en CA3 expresada en unidades arbitrarias de densidad óptica. C) Sinaptofisina en GD expresada en unidades arbitrarias de densidad óptica. Ctrl 1D= control de nado de un día; Ent 1D=entrenado un día; Ctrl 4D=control de nado cuatro días; Entr 4D= entrenado cuatro días.

6.4 Expresión de sinaptofisina en el área de CA3 del hipocampo asociada al entrenamiento en el laberinto de agua, bajo el efecto de la inactivación de PKC en dicha área.

Para determinar la expresión de sinaptofisina en el área de CA3 se realizaron tres geles por medio de Western Blot (figura 11). El análisis de varianza (ANOVA) realizado a los mismos, muestra una diferencia significativa entre los grupos ($F_{5,12} = 3.483$, $p < 0.05$) y la prueba post-hoc de Fisher mostró diferencias significativas entre el control 1 día y queleritrina 11 días ($p < 0.01$) así como entre control 11 días y queleritrina 11 días ($p < 0.05$).

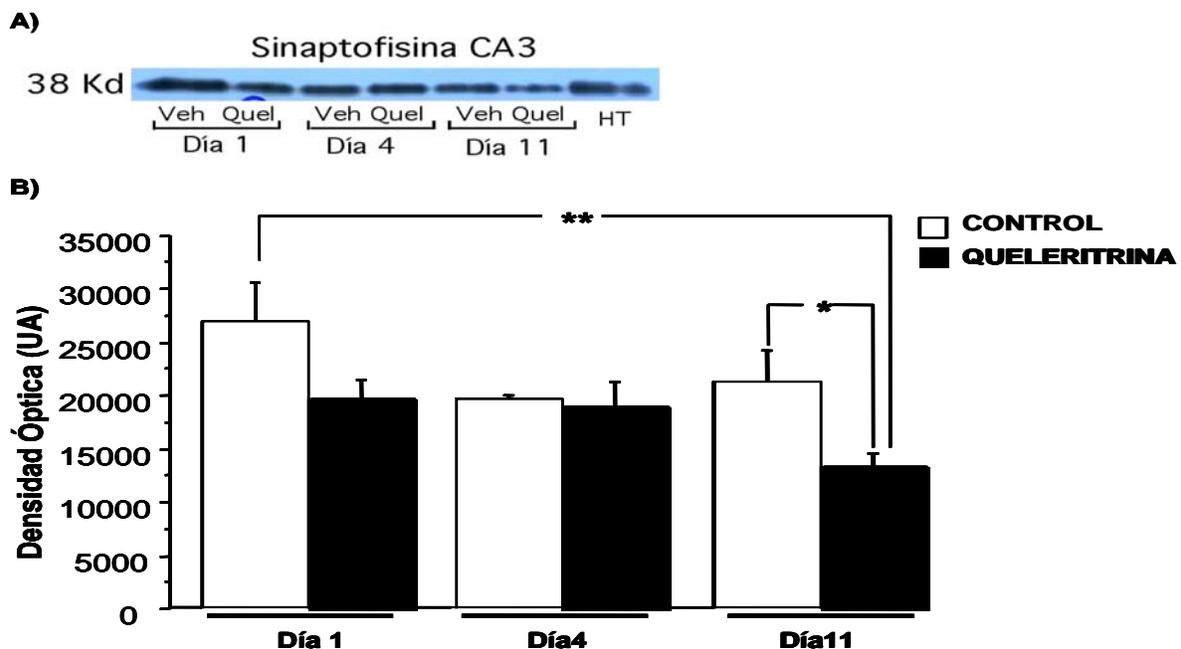


Figura 11. Expresión de Sinaptofisina en el área de CA3. A) Blot representativo. B) Análisis de la densidad óptica, en el eje de las "Y" se muestra la densidad óptica del grupo control y del grupo de queleritrina expresada en unidades arbitrarias y en el eje de las "X" se muestra los días de entrenamiento de cada grupo. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$

Para corroborar que el cambio observado en la expresión de sinaptofisina fuera efecto de la inactivación de PKC en el área de CA3 y del entrenamiento, se comparó con la región del giro dentado, en la cual no se han observado cambios en su densidad sináptica posterior a un sobreentrenamiento (Ramírez-Amaya et al., 1999).

El análisis de varianza (ANOVA) no muestra una diferencia significativa entre los grupos de Queleritina y el control de giro dentado, realizada para los tres geles realizados por medio de Western Blot (figura 12). Lo anterior sugiere que el cambio en la expresión de Syp observado en CA3 es efecto del entrenamiento y el tratamiento, mostrando una tendencia a disminuir la cantidad de sinaptofisina detectada en CA3 en el grupo de animales que fue sometido a inyecciones de queleritina antes del entrenamiento y sacrificado después de la prueba de MPL.

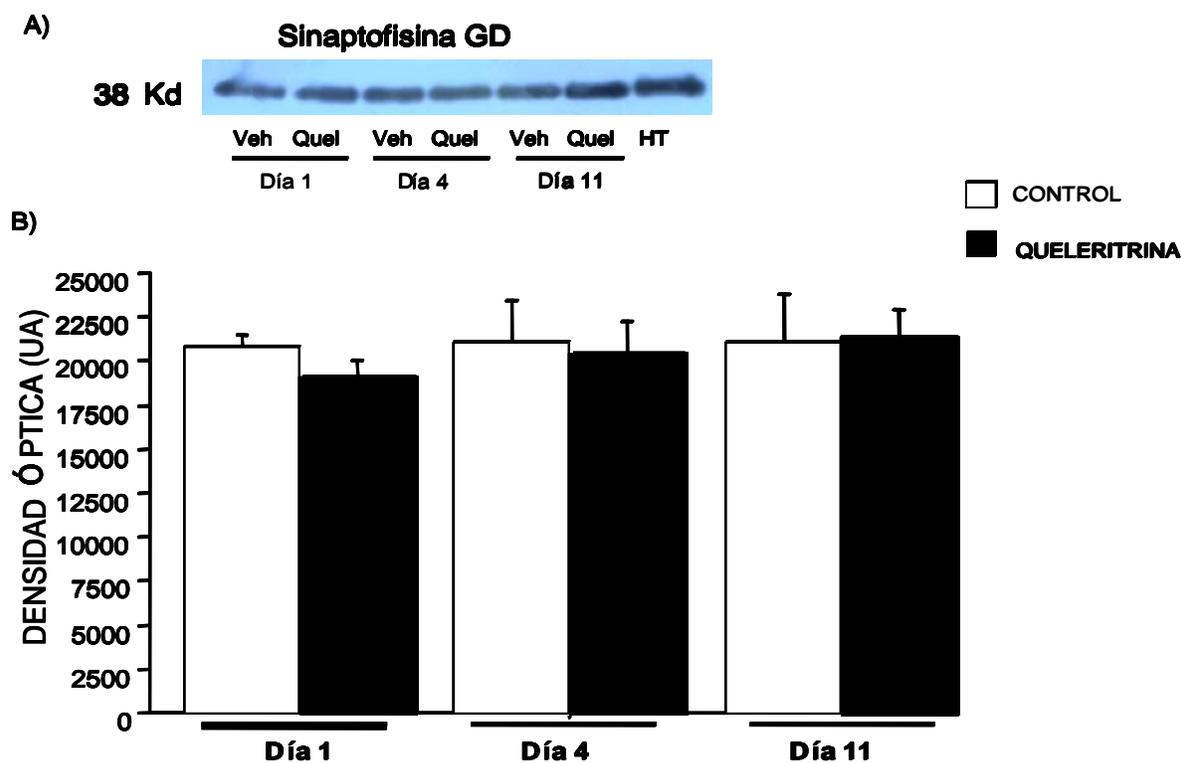


Figura 12. Expresión de Sinaptofisina en el área de GD. A) Blot representativo. B) Análisis de la densidad óptica, en el eje de las "Y" se muestra la densidad óptica del grupo control y del grupo de queleritina expresada en unidades arbitrarias y en el eje de las "X" se muestra los días de entrenamiento de cada grupo.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Participación de PKC en la consolidación de una tarea espacial.

En el presente estudio mostramos que el aprendizaje de una tarea espacial en este caso el laberinto acuático de Morris, dependiente de hipocampo, no se ve afectado por la inyección de un inhibidor de PKC (Quelitrina). Como se mostró en los resultados, el aprendizaje de ambos grupos no mostró diferencia significativa durante el entrenamiento teniendo como resultado un comportamiento similar lo que nos sugiere que este tipo de aprendizaje no requiere de la activación de PKC en el área de CA3.

En cuanto a la formación de la memoria espacial a largo plazo, los resultados muestran diferencias significativas entre ambos grupos durante la prueba a largo plazo. El grupo de quelitrina presenta una mayor latencia al ubicar el lugar donde se encontraba la plataforma durante el entrenamiento además de menor número de cruces y tiempo en el cuadrante blanco (ubicación de la plataforma); mostrando estos datos un efecto amnésico debido al tratamiento mientras que el grupo control presenta una menor latencia, mayor número de cruces y un mayor tiempo en el cuadrante blanco. Por lo que estos datos nos sugieren que el proceso de consolidación de la memoria a largo plazo de una tarea espacial dependiente de hipocampo, requiere de la activación de PKC en el área de CA3.

Nuestros datos coinciden con los obtenidos por Noguès *et al.*, (1996) en referencia al proceso de aprendizaje, donde muestran que al inhibir la actividad de PKC en el área de CA1 del hipocampo con polimixina B (PMB), los animales son capaces de aprender una tarea de discriminación espacial realizada en un laberinto radial mostrando un comportamiento similar al del grupo control.

Por otro lado gracias al trabajo realizado por Hussain y Carpenter (2003) se ha demostrado que la administración de queleritrina en el área de CA3 no afecta la transmisión sináptica tanto a nivel pre-sináptico como post-sináptico, dado que tanto la respuesta de facilitación presináptica como los potenciales excitadores post-sinápticos no presentan alteraciones en la magnitud ni en la amplitud de la transmisión sináptica. Por lo que el aprendizaje y la memoria a corto plazo pueden estar sustentados en la actividad eléctrica del área junto con las cascadas de señalización independientes de PKC (Jhonston, *et al.*, 2003). Como se sabe la memoria a corto plazo involucra cambios efímeros, eléctricos o moleculares entre las redes neuronales, de acuerdo a lo observado por Hussain *et al.*, tienen lugar estos procesos sin la interacción de PKC, permitiendo con ello la adquisición del aprendizaje espacial y el establecimiento de una memoria a corto plazo.

En lo referente al proceso de consolidación de la memoria, nuestros datos difieren de los obtenidos por Noguès *et al.*, (1996) ya que el tratamiento con PMB produce una atenuación en la consolidación de la memoria al compararlo con el grupo control, lo cual no ocurre al administrar queleritrina en al área de CA3 ya que las ratas presentan un efecto amnésico posterior al entrenamiento, por lo que la diferencia observada entre CA1 y CA3 puede ser debido a la activación de PKC a diferentes tiempos en los subcampos hipocampales. Esto ha sido comprobado en el parpadeo condicionado en conejos, el cual es un aprendizaje asociativo dependiente de hipocampo (Moyer *et al.*, 1996; Olds *et al.*, 1990). Este tipo de aprendizaje está basado en la asociación de estímulos, uno de carácter condicionado (i.e. un sonido) y otro incondicionado (i.e. soplo en el ojo del animal) teniendo como consecuencia una respuesta condicionada (parpadeo).

Durante el proceso de adquisición de la tarea, se presenta un aumento en la inmunoreactividad de PKC γ en el *stratum oriens* de CA3 pero no en CA1, a las 24 horas se mostró un cambio en el *stratum pyramidale* de CA1 y por último a las 48 horas posterior al entrenamiento se observó un cambio en el *stratum oriens* de CA1. Por lo anterior podemos ver que la activación de PKC es dependiente tanto del tipo de tarea como de la zona de estudio, lo cual puede contribuir al

procesamiento de los diferentes estímulos percibidos del entorno, haciendo una diferencia en el funcionamiento de PKC en las áreas de CA3 y CA1. De acuerdo a modelos computacionales y a la estructura de sus conexiones al área CA3, se le denomina como un sitio de asociación, el cual ayuda a la adquisición y consolidación de la memoria declarativa (Florian & Roulet, 2004; Stupien, G. *et al.*, 2003). Como ya se mencionó esta consolidación se ve afectada por la inactivación de PKC, en consecuencia, el procesamiento de la información se vio interrumpido, por lo que el establecimiento de una memoria a largo plazo no tuvo ocurrencia. Si la información es procesada en el área de CA3 y posteriormente enviada a CA1, los requerimientos de la activación de PKC serán diferentes en cada área, existiendo la posibilidad de que la inhibición de PKC no afecte el funcionamiento de CA1, lo cual coincide con lo obtenido por Noguès *et al.* (1996) no así en CA3 ya que la consolidación es dependiente de PKC y toma mas de cuatro días en darse.

Por otro lado, la activación de PKC inducida por el aprendizaje en este caso el espacial, puede estar mediado por las diferentes vías de neurotransmisión presentes en el hipocampo. Las dos posibles vías de activación mayormente involucradas son la glutamatérgica y la colinérgica, ambas encontradas ampliamente en hipocampo (Cassel, JC *et al.*, 1997; Bici & Kiss, 1998; Dutar, P., *et al.*, 1995) y que se ha comprobado su participación en este tipo de aprendizaje (Morris *et al.*, 1984, 1986; Linch, MA 2004; Balderas *et al.*, 2004; Herrera-Morales *et al.*, 2007).

El estudio de la vía colinérgica, a demostrado que posterior a una tarea espacial, la actividad de la isoforma PKC γ aumenta en el hipocampo, al igual que su traslocación del citoplasma a la membrana plasmática, donde permanece activa. Asimismo la translocación de PKC se ve favorecida por los receptores muscarínicos principalmente se ha relacionado con el receptor M $_1$ (Messing, *et al.*, 1989), debido a que se ha observado que posterior a un estímulo de este receptor se produce un incremento Ca $^{2+}$, esto a causa de la apertura de canales de calcio en el retículo endoplasmático permitiendo así la salida del calcio, el cual puede conllevar a la traslocación y activación de PKC (Sharma *et al.*, 1997).

En el 2004, Rossi *et al.*, encontraron que el deterioro de la memoria espacial en ratas adultas esta asociado al déficit presentado en la traslocación de PKC γ . De acuerdo con este estudio, la señal tiene inicio en la cascada producida por la unión de la proteína G al receptor M1, el cual se ve disminuido en ratas adultas teniendo como consecuencia una menor traslocación de PKC γ por lo que comparado con ratas jóvenes estas últimas presentan un radio somato-dendrítico menor, lo cual es reflejado en una mejora en la consolidación de la memoria.

En nuestro laboratorio al antagonizar el receptor M1 con Pirenzepina en el área de CA3 no presento ningún efecto durante aprendizaje espacial; mientras que la memoria a largo plazo si se vio afectada, coincidiendo con el efecto inhibitor de Queleritrina. Esto nos sugiere que una de las vías que puede estar encargada de la consolidación de una tarea espacial es la colinérgica por medio de su receptor M1, el cual activará a PKC teniendo como resultado el establecimiento de la memoria a largo plazo.

En referencia a los cambios que tienen lugar justo después de la situación de aprendizaje, se ha podido comprobar que durante el periodo entre los 5 y 50 minutos posteriores al entrenamiento se incrementa de forma significativa la actividad de PKC (Colley *et al.*, 1990), actividad que hemos demostrado necesaria para la consolidación de la memoria espacial en CA3 y toma mas de cuatro días en formarse. La cual puede estar mediada por los receptores muscarínicos de ACh y los receptores metabotrópicos del Glu (Conn & Sweatt, 1993), los cuales están implicados en el aprendizaje espacial (Balderas *et al.*, 1996; Herrara-Morales *et al.*, 2007).

La actividad de PKC, se ha visto involucrada en la activación de otras proteínas, ejemplo de ello es la MAPK (Proteína cinasa activada por mitógenos), donde se ha observado que posterior a la activación de PKC en el área CA1 del hipocampo aumenta su actividad (Enghish & Sweatt, 1996), efecto que ha sido observado en varios tipos celulares, así como su activación posterior a tareas asociativas (Atkins *et al.*, 1998). Por su parte Roberson *et al.*, (1999) demostraron que la activación de

MAPK iniciada por PKC está mediada por la vía de señalización de MEK (Cinasa mitógeno/ERK). Asimismo la cascada de activación de MAPK estimula la fosforilación del factor de transcripción CREB [Et al] (Jhonston, *et al.*, 2003), el cual se produce durante los primeros minutos de exposición al contexto de aprendizaje (Routtenberg, 2001) actuando a nivel del ADN por medio de una serie de pasos, teniendo como resultado el aumento en la transcripción de genes reflejado en la consolidación de la memoria y un cambio conductual en los sujetos (Jhonston *et al.*, 2003).

Con lo anterior podemos decir que la memoria a largo plazo no suele formarse de un modo instantáneo al recibirse la información, sino que resulta de un proceso complejo íntimamente relacionado con la transducción de señales culminando con la síntesis de proteínas (figura 13).

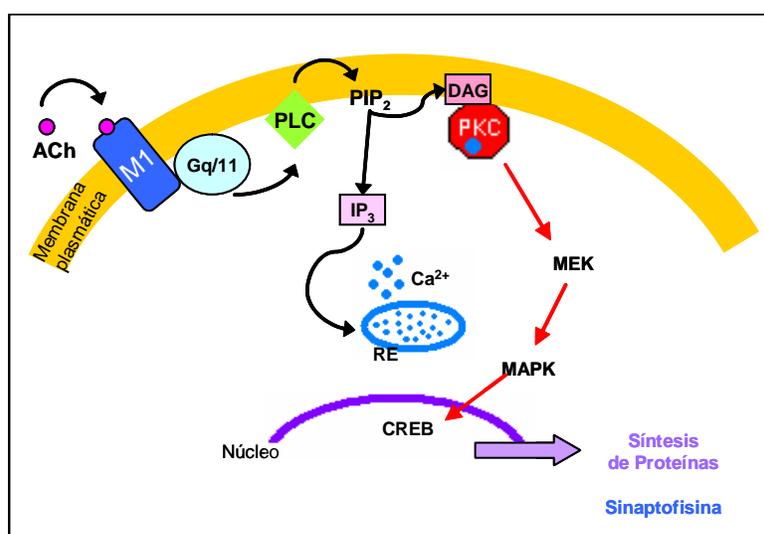


Figura 13 Activación de PKC y su posible vía de señalización en el proceso de consolidación de la memoria. La ACh se une a su receptor M1 el cual se acopla a su proteína G, está última activa a PLC e hidroliza a PIP₂, y tiene como resultado la producción de DAG y IP₃; el IP₃ difunde hasta el retículo endoplasmático y libera el calcio almacenado ahí, este se une a PKC, posteriormente PKC se trasloca a la membrana uniéndose al DAG, culminando en la activación de PKC. La activación de PKC conlleva a una segunda activación de MEK, el cual puede activar a MAPK. Esta última estimula la fosforilación del factor de transcripción CREB y con ello aumenta la transcripción de genes al actuar sobre el ADN, culminando esta vía de señalización en la síntesis de proteínas o nuevo ARNm.

7.2 Cambio en la expresión de Syp en el área CA3.

Como se describen los resultados, la expresión de Syp en ratas intactas entrenadas y el control de nado se incrementa conforme aumenta el tiempo de entrenamiento o nado, estos datos coinciden con los obtenidos por Ramírez-Amaya *et al.*, en 1999, quienes encontraron que posterior a un sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris, la región de CA3 presenta un aumento significativo en la densidad sináptica en las terminales de las fibras musgosas del stratum oriens de dicha región mientras que en GD dicho cambio no

fue observado, lo cual sugiere que esta metodología es de utilidad para saber si el aumento de la densidad sináptica en el SO de CA3 en ratas sobreentrenadas presenta funcionalidad, debido a que Syp se ha relacionado con la liberación de neurotransmisores.

Al analizar la densidad óptica en la región CA3 en animales tratados con Queleritina o Vehículo, estos muestran diferencias significativas, siendo menor la expresión de Syp en los animales tratados con queleritina, esta diferencia no se encontró en la región del giro dentado (GD). Coincidiendo con los estudios realizados por Serrano (2007) al antagonizar el receptor muscarínico M1 en la región de CA3 mediante el uso de pirenzepina, donde encontró que esta antagonización además de afectar el establecimiento de una MLP, la expresión de sinaptofisina en el área de CA3 es menor en aquellos individuos que no establecieron esta memoria, lo cual sugiere que los cambios en la cantidad de Syp están relacionados con el déficit mostrado en la consolidación de una tarea espacial. Cabe señalar que se obtuvo un efecto sham en la expresión de Syp debido a que esperaríamos que por lo menos el grupo control mostrara un aumento en la expresión de esta proteína al transcurrir de los días del entrenamiento parecido al obtenido en ratas intactas, este mismo efecto fue reportado por Serrano (2007) utilizando otro tipo de control y fármaco, por lo que

tal efecto posiblemente fue ocasionado por la cirugía a la que fueron sometidos los animales.

Por otro lado, Moser *et al.*, en 1994, encontraron que al entrenar animales adultos en un medio complejo estimulando la conducta exploratoria, éstos presentaban un aumento significativo en la densidad de las espinas dendríticas de CA1. Además, si estos animales eran sometidos al aprendizaje de una tarea espacial, eran más eficientes que aquellos que no habían sido entrenados en un ambiente complejo, implicando de esta manera una funcionalidad a los cambios morfológicos observados (Op cit. Balderas, I. *et al.*, 1996).

La Syp ha sido utilizada ampliamente como un marcador de densidades sinápticas (Wick, 2000) debido a estar asociado a la membrana de las vesículas sinápticas (VS's) por lo que es posible su uso en el trazo de movimientos de las mismas en la neurona, esta proteína al estar sola o en asociación con proteínas homologas se ha visto involucrada en múltiples e importantes aspectos de la exocitosis de VS's y la formación del poro de fusión (Op cit. Valtorta *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha encontrado que es la primera proteína expresada en altas cantidades durante la sinaptogénesis (Op cit. Tarsa & Yukiko 2002).

La sobreexpresión de esta proteína en embriones de *Xenopus* tiene como resultado un fuerte incremento en la frecuencia de las corrientes sinápticas espontáneas y un aumento en la liberación de ACh, sugiriendo que Syp posiblemente esté implicada en determinar la cantidad de neurotransmisor liberado y/o en la excitación y el acoplamiento para la secreción (Op. cit en Valtorta, *et al.*, 2004).

Tomando en cuenta lo anterior, la disminución en la expresión de Syp en CA3 mostrada en este trabajo posiblemente sea efecto del daño ocasionado en el establecimiento de la memoria a largo plazo mediante la inactivación de PKC, ya que se sabe que los eventos plásticos como el cambio en la estructura, la distribución y la sinaptogénesis están relacionados con la memoria.

VIII. CONCLUSIONES

- La adquisición de una tarea espacial no presenta ningún déficit al inactivarse PKC en el área de CA3.
- La inactivación de PKC en el área de CA3 deteriora la consolidación de una tarea espacial en el laberinto acuático de Morris.
- El decremento en la expresión de Sinaptofisina en el área de CA3 posiblemente este relacionado al déficit ocasionado por la inactivación de PKC en la consolidación de la memoria espacial.

IX. PERSPECTIVAS

El avance en el estudio de los procesos del aprendizaje y la memoria ha permitido tener una visión más amplia acerca de los mecanismos empleados en cada proceso y la importancia que tienen en la adaptación de los organismos al ambiente. La complejidad del cerebro hace más difícil la integración de estos mecanismos, pero no por ello dejan de ser importantes, por lo que hasta ahora solo se tienen bosquejos de su funcionamiento.

El estudio del área CA3 del hipocampo en el aprendizaje y la memoria espacial es reciente, por lo que muchas preguntas se tendrán que resolver como: ¿Qué mecanismos son la base del aprendizaje, además de la ACh y el Glu que otros neurotransmisores participan en este proceso, las vías de señalización que estos desencadenan? ¿Cómo se integra la información que llega a CA3? ¿Qué procesos participan en la reactivación de la memoria?

En este estudio mostramos la importancia de PKC en la consolidación de la MLP, los cambios en la expresión de Syp esta relacionado con esta consolidación y por último un mecanismo para dividir el proceso de adquisición y consolidación de un tarea espacial, esto contribuye al entendimiento de estos procesos y un potencial terapéutico de como inhibidor de la memoria.

IX. REFERENCIAS

- 1 Alder, J., Kanki, H., Valtorta, F., Greengard, P & Poo MM. Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *J Neurosci.* 1995; 15 (1 Pt 2): 511-9
- 2 Alkon, DL., Epstein, H., Kuzirian, A., Bennett, M., Catherine, N & Thomas J. Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *PNAS* 2005; 102: 16432–16437
- 3 Almaguer-Melián, W & Bergado-Rosado, JA. Interactions between the Hippocampus and the Amygdale in Synaptic Plasticity Processes. A key to understanding the Relations between Motivation and Memory. *Rev. Neurol* 2002; 35: 586-93
- 4 Almers, V & Tse, FW. transmitter release from synapses, does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* 1990; 5: 813-818
- 5 Amaral, DG & Witter, MP. The tree-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989; 31: 571-591
- 6 Amaral, DG., Ishizuka N. & Claiborne B. Neurons, number and the hippocampal network. *Progress in Brain Research* (Eds Storm-Mathisen J., Zimmer J. and Otterson O. P.) 1990; 83: 1-11
- 7 Atkins, CM., Selcher, JC., Petraitis, JJ., Trzaskos, JM & Sweatt, JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci.* 1998; 7: 602-9

8 Auerbach, J & Segal, M. A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 1994; 72: 2034–2040

9 Auerbach, JM & Segal, M. Peroxide modulation of slow on set potentiation in rat hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17: 8695–8701

Asztely & Gustafson, 1996

10 , F & Gustafson, B. Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 1996; 12 (1): 1-11

11 Bailey-Craig H., Bartsch, D & Kandel, ER. Toward A molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 26: 93(24): 13445–13452

12 Balderas, I., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. Cambios morfológicos asociados a la memoria. *Rev Neurol* 2004; 38 (10): 944-948

13 Barnes, CA & McNaughton, BL. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of hippocampal synapses. *Behav Neurosci* 1985; 99: 1040-1048

14 Baraban, JM., Snyder, SH & Alger, BE. Protein kinase C regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: Electrophysiological effects of phorbol esters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985 USA g: 2538-2542

15 Bashir, ZI., Alford, S., Davies, SN., Randall, AD & Collingridge, GL. Long-term potentiation of NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 1991; Jan 10; 349 (6305): 156-8

16 Ben-Ari, Y & Represa, A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 1990; 13: 312-

- 17 Bennett, MR. The concept of long-term potentiation of transmission at synapses. *Progress in Neurobiology* 2000; 60: 109-137
- 18 Bergado, JA., Moreno, H & Nunez, N. Fimbria-fornix lesion impairs long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat. *Biol Res* 1996; 29 (2): 197-202
- 19 Bergado, JA., Moreno, H., Soto, J., Castellano, O & Castillo, L. Septal fetal tissue transplants restore long-term potentiation in the dentate gyrus of fimbria-fornix-lesioned rats. *J Neural Transplant Plast* 1997; 6(1): 31-40
- 20 Bergado-Rosado, JA & Almaguer-Melian, W. Mecanismos de neuroplasticidad. *Rev Neurol* 2000; 31 (11): 1074-1095
- 21 Bermúdez-Rattoni, F & Escobar, MI. Neurobiology of learning. In Pawlik K, Rosenwig MR, eds. *International handbook of psychology*. London: Sage Publications 2000; p 87 – 109
- 22 Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Sudhof, T.C., Rettig, J & Brose, N. Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 1998; 21: 123-136
- 23 Bici ES & Kiss JP. Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interaction. *Hippocampus* 1998; 8: 566-607
- 24 Bliss, TV & Collingridge, GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361: 31–39
- 25 Brandeis, R., Brandys, Y & Yehuda, S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 1989; 48: 26-69

- 26 Cassel, JC., Duconseille, E., Jeltsch, H & Will, P. The frimbria-fornix/ angular bundle pathways: A review of neurochemical and behavioral approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 1997; 51: 663-716
- 27 Cavazos, JE & Sutula TP. Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis. *Brain Res* 1990; 527: 1-6
- 28 Coffey, ET., Sihra, T.S & Nicholls, DG. Protein kinase C and the regulation of glutamate exocytosis from cerebrocortical synaptosomes. *J Biol Chem* 1993; 268: 21060-21065
- 29 Colley, PA., Sheu, FS & Routtenberg, A. Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact. *J Neurosci* 1990; 10: 3353-60
- 30 Collingridge, GL & Bliss, TV. NMDA receptors-their role in long-term potentiation. *Trends Neuroscience* 1987; 10: 288-293
- 31 Colombo, PJ & Gallagher, M. Individual differences in spatial memory among aged rats are related to hippocampal PKC-gamma immunoreactivity. *Hippocampus* 2002; 12 (2): 285-9
- 32 Conn PJ & Sweatt JD. Protein Kinase C in the Nervous System. In: Protein Kinase C, J.F. Kuo, ed. Oxford: Oxford Univ. Press, 1993; pp 199–235.
- 33 Cousin, MA., Tan, TC & Robinson PJ Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the phosphatases dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J Neurochem* 2001; 76: 105-116

- 34 De Riemer, SA., Strong, JA., Albert, KA., Greengard, P & Kaczmarek, LK. Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature* 1985; 313: 313-316
- 35 Degroot. A., Parent, MB. Dudchenko, PA & Taube JS. Correlation between head direction cell activity and spatial behavior on a radial arm maze. *Behav Neurosci* 1997; 111 (1): 3-19
- 36 Dudchenko, PA., Goodridge, JR., Seiterle, DA & Taube, JS. Effects of repeated disorientation on the acquisitional spatial tasks in rats: Dissociation between the appetitive radial arm maze and aversive water maze. *J Exp. Psychol Anim Behav Process* 1997; 23: 194-210
- 37 Dutar, P., Bassant, MH., Senut, MC & Lamour, Y. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev* 1995; 75 (2): 393-427
- 38 Eichenbaum, H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res* 1999; 103: 123-33
- 39 English, JD & Sweatt, JD. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long-term potentiation. *J Biol Chem* 1996; 271: 24329-24332
- 40 Escobar, ML., Barea-Rodríguez, EJ., Derrick, BE., Reyes, JA & Martínez JL Jr. Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res* 1997; 751: 330-5
- 41 Evans, GJ & Cousin, MA. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochemical Society Transaction* 2005; 33 (6): 1350 – 1353

- 42 Fadda, F., Cocco, S., & Stancampiano, R. Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuro report* 2000; 11, 2265–2269
- 43 Fadda, F., Melis, F., & Stancampiano, R. Increased hippocampal acetylcholine release during a working memory task. *European Journal of Pharmacology* 1996; 307, R1–R2
- 44 Farley, J & Auerbach, S. Protein kinase C activation induces conductance changes in *Hermissenda* photoreceptors like those seen in associative learning. *Nature* 1986; 3 (19): 220-223
- 45 Fletcher, T.L., Cameron, P., De Camilli, P & Banker, G. *J. Neurosci* 1991; 11: 1617–1626
- 46 Florian, C & Roulet, P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research* 2004; 154: 365–374
- 47 Francis, HW., Scott, JC & Manis, PB. Protein kinase C mediates potentiation of synaptic transmission by phorbol ester at parallel fibers in the dorsal cochlear nucleus. *Brain Res* 2002; 951: 9-22
- 48 Genoud, S., Pralong, W., Riederer, BM., Eder, L., Catsicas, S & Muller, D. Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures. *J Neurochem* 1999; 72: 1699-1706
- 49 Gold, Paul E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology learning and memory* 2003; 85: 194-210

- 50 Golski, S., Olds, J.L., Mishkin M., Olton, D.S. & Alkon D.L. Protein kinase C in the hippocampus is altered by spatial but not cued discriminations: a component task analysis. *Brain Res* 1995; 676(1): 53-62
- 51 Goodridge, J.P., Dudchenko, P.A., Worboys, K.A., Golob, E.J. & Taube, J.S. Cue control and head direction cells. *Behav Neurosci* 1998; 112: 749-761
- 52 Gorman, L.K., Pang, K., Frick, K.M., Givens, B. & Olton, D.S. Acetylcholine release in the hippocampus: effects of cholinergic and GABAergic compounds in the medial septal area. *Neurosci Lett* 1994; 166(2): 199-202
- 53 Gutiérrez, R., Rodríguez-Ortiz, C., De la Cruz, V., Núñez-Jaramillo, L. & F. Bermúdez-Rattoni. Cholinergic dependence of the taste memory formation; evidence of two distinct processes. *Neurobiology learning and memory* 2003; 85: 323-331
- 54 Hepp, R., Cabaniols, J.P. & Roche P.A. Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A. *Et al* 2002; 532, 52-56.
- 55 Herrera-Morales, W., Mar, I., Serrano, B. & Bermúdez-Rattoni, F. Activation of Hippocampal Postsynaptic Muscarinic receptors is involved in Long-Term spatial memory formation. *European Journal of Neuroscience*. 2007; 25 (5): 1581-8
- 56 Holt, W. & Maren, S. Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *J Neurosci* 1999; 19 (20): 9054-62
- 57 Hussain, R.J. & Carpenter, D.O. The effects of protein kinase C activity on synaptic transmission in two areas of rat hippocampus. *Brain Res* 2003; 990 (1-2): 28-37

- 58 Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E & Izquierdo, I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res* 1997; 22 (4): 507-15
- 59 Johnston, MV., Alemi, L & Harum, KH. Learning, memory, and transcription factors. *Pediatric Research* 2003; 53 (3): 369-374
- 60 Kandel, ER & Hawkins, D. The Biological Basis of Learning and Individuality. *Scientific American*. 1992; 267 (3): 79-86
- 61 Kandel, ER., Schwartz, JH & Jessell, TM. *Principios de neurociencia*. Eds. McGraw-Hill- Interamericana 2000 p 1259-1267
- 62 Kandel E. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001; 294: 1030-8
- 63 Klann, E., Chen, S.J. & Sweatt, J.D. Mechanism of protein kinase C activation during the induction and maintenance of long-term potentiation probed using a selective peptide substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8310-8313.
- 64 Klintsova, AY & Greenough, WT. Synaptic plasticity in cortical systems. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 203-8
- 65 Knowlton, BJ., Mangels, JA & Squire, LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science* 1996; 273: 1399-1402
- 66 Kudoh, SN., Nagai, R., Kiyosue, K & Taguchi, T. PKC and CaMKII dependent synaptic potentiation in cultured cerebral neurons. *Brain Res* 2001; 915: 79-87
- 67 Kuffler, S.W., Nicholls, TG & Martin, AM. *From neuron to brain*. Massachusetts: Sinauer 1984

- 68 Lamprecht, R & LeDoux, J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 45-54
- 69 Laroche, S., Dorere, V & Redim Del Negro C. Short and long term-changes in synaptic physiology in the dentate gyrus during associative learning in the rat. *Soc Neurosci abst* 1991; 17: 558-562
- 70 Lee, I., Jerman, TS & Kesner, RP. Disruption of delayed memory for a sequence of spatial locations following CA1- or CA3-lesions of the dorsal hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory* 2005; 84: 138–147
- 71 Lynch, MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev* 2004; 84: 87-136
- 72 Linden, DJ & Routtenberg, A. The role of protein kinase C in long-term potentiation: a testable model. *Brain Res Rev* 1989; 14: 279-296
- 73 Malcolm, P., Caulfield, N & Birdsall, JM. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological Reviews* 1998; 50: 279-290
- 74 Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, MW., Bliss, TV., Vanhose, AM., Weitlauf, C., Kandel, ER., Winder, DG & Mansuy, IM. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 2001; 104: 675-686
- 75 Maguire, EA., Burges, N., Donnett, JG., Frackowiak, RSJ., Frith, CD & O'Keefe, J. Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* 1998; 280: 921-4
- 76 Manzano-Palomo, S., De la Morena-Vicente, MA & Barquero MS. Neurotransmisores en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 2006; 42 (6): 350-353

- 77 McGaugh, JL. Time-depend processes in memory storage. *Science* 1996; 153 (742): 1351-1358
- 78 McMahon, HT., Bolshakov, VY., Janz, R., Hammer, RE., Siegelbaum, S & Südhof, TC. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for transmitter release. *PNAS* 1996; 93: 4760-4764
- 79 McNaughton, BL., Barnes, CA., Roag, Baldwin, J., Rasmussen & M. Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. *J Neurosci* 1986; 6: 563-571
- 80 Messing, RO., Stevens, AM., Kiyasu, E & Sneade, AB. Nicotinic and muscarinic agonists stimulate rapid protein kinase C translocation in PC12 cells. *J Neurosci* 1989; 2: 507-12.
- 81 Milner, B., Corkin, S & Teuber, HL. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of HM. *Neuropsychology* 1968; 6: 215-34
- 82 Milner, B., Squire, LR & Kandel, ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 1998; 20: 445-68
- 83 Mochly-Rosen, D., Henrich, CJ., Cheever, L., Khaner, H & Simpson PC. A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Mol Bio Cell* 1990; 1: 693-706
- 84 Mochly-Rosen, D & Gordon, AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB Journal* 1998; 12: 35-42
- 85 Monck, JR & Fernandez, JM. The exocytotic fusion pore. *J Cel Biol* 1992; 19: 1395-1404

- 86 Morgado I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol* 2005; 40: 289-97
- 87 Morris, RG., Garrud, P., Rawlins, JNP y O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297: 681-683
- 88 Morris, RG. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984; 11(1): 47-60
- 89 Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *ET AL*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986; 319:774-776
- 90 Morris, RG., Schenk, F., Tweedie, F & Jarrad, LE. Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. *Eur J Neurosci* 1990; 2: 1016-28
- 91 Morris, JS., Ohman, A & Dolan, RJ. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdale. *Nature* 1998; 393: 417-8
- 92 Moser, MB., Trommald, M & Andersen P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *PNAS USA* 1994; 91: 12673-5
- 93 Moyer, JR Jr., Thompson, LT & Disterhoft, JF. Trace eye blink conditioning increases CA1 excitability in a transient and learning-specific manner. *J Neurosci.* 1996; 17: 5536-46
- 94 Muller, RU & Kubie, JL. The firing of hippocampal place cells predicts the future position of freely moving rats. *J Neurosci* 1989; 9: 4101-10

- 95 Muller, RU., Kubie, JL., Bosttock, EM., Taube, JS & Quirk, GJ. Spatial firing correlates of neuron in the hippocampal formation of freely moving rats. In Paillard J, ed. Brain and space. London: Oxford University Press 1991; 269-333
- 96 Nadel L. The hippocampus and space revisited. Hippocampus 1991; 1: 221-229
- 97 Newton, AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. J. Biol. Chem. 1995; 270: 28495-28498
- 98 Noguès, X., Micheau, J & Jaffard, R. Protein kinase C activity in the hippocampus following spatial learning tasks in mice. Hippocampus 1994; 2: 71-78
- 99 Noguès, X., Micheau, J. & Jaffard, R Investigations on the role of hippocampal protein kinase C on memory processes: pharmacological approach. Behav Brain Res 1996; 75: 139-146
- 100 Olds, JL., Golski, S., McPi-lie, DL., Olton, DL., Mishkin, M & Alkon, DL. Discrimination learning alters the distribution of protein kinase C in the hippocampus of rats. J Neurosci 1990: 3707-13
- 101 O'Keefe, J & Dovstrovsky J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. Brain Res 1971; 34: 171-175
- 102 O'Keefe, J & Nadel, L. The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford. Clarendon Press. 1978, 570 pp.
- 103 Paxinos, G & Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed., Academic Press, San Diego. 1986

- 104 Penfield, W & Milner, B. Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *Arch Neurol Psychiatry* 1958; 79: 47-59
- 105 Powell, KA., Valova, VA., Malladi, CS., Jensen, ON., Larsen, MR & Robinson PJ. Phosphorylation of dynamin I on Ser-795 by protein kinase C blocks its association with phospholipids. *J Biol Chem* 2000; 275: 11610-11617
- 106 Quirk, GJ., Muller, RU & Kubie, JL. The firing of hippocampal place cells in the dark depends on the rat's recent experience. *J Neurosci* 1990; 10: 2008-17
- 107 Raiteri, M., Leardi, R & Marchi, M. Heterogeneity of Presynaptic Muscarinic. Receptors Regulating Neurotransmitter Release in the Rat Brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1984; 228: 209-214
- 108 Ramírez-Amaya, V., Escobar, ML., Chao, V & Bermúdez-Rattoni, F. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 1999; 9: 631-6
- 109 Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, ML & Bermúdez-Rattoni, F. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci* 2001; 21: 7340-8
- 110 Ramirez-Lugo, L., Miranda MI., Escobar ML., Espinosa E & Bermudez-Rattoni, F. The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 2003; 79 (2): 184-93
- 111 Ranck JB. Head direction cells in the deep layers of dorsal presubiculum in freely moving rats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 1984; 10, 599
- 112 Ranck, JB. Head direction cells in the deep layer of dorsal presubiculum in freely moving rats. In Buzsake G, Vanderwolf CH, eds. *Electrical activity of the Archicortex*. Budapest: Akademia Kiado, 1985; 217-20

- 113 Rendón, EP & Robles, M. Activación de la familia de proteínas cinasas C: avances y perspectivas. BEB 2000; 20 (1): 19-29
- 114 Riegel, G & Reymann, KG. Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. Acta Physiol Scand 1996; 157 (1): 1–19
- 115 Rossi, MA., Mash, DC & de Toledo-Morrell, L. Spatial memory in aged rats is related to PKC-gamma-dependent G-protein coupling of the M1 receptor. Neurobiol Aging 2005; 26 (1): 53-68
- 116 Routtenberg, A. It's about time. In: Memory consolidation. American Psychological Association 2001; 17-34
- 117 Sacktor, TC & Schwartz, JH. Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in Aplysia sensory neurons. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 2036-2039
- 118 Sharma, VK., Colecraft, HM., Rubin, LE & Sheu S-S. Does mammalian heart contain only the M2 muscarinic receptor subtype? Life Sci 1997; 60: 1023-1029
- 119 Serrano Flores, Bárbara Pamela. Participación de receptores muscarínicos post-sinápticos en la región de CA3 del hipocampo durante la adquisición y/o consolidación de una memoria espacial. Tesis (Bióloga). México, D.F. UNAM Facultad de Ciencias, 2007
- 120 Serrano, PA., Rodriguez, WA., Pope, B., Bennett, EL. & Rosenzweig, MR. Protein kinase C inhibitor chelerytrine disrupts memory formation in chicks. Behavioral Neuroscience. 1995; 109 (2): 278-284

- 121 Shapiro, ML & Eichenbaum, H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus* 1999; 9: 365-84
- 122 Sherrington, CS. *The Integrative Action of the Nervous System*, 2nd ed (Yale Univ. Press, New Haven, New Jersey, 1906). (1983)
- 123 Shinoe, T., Matsui, M., Taketo, M & Manabe, T. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 2005; 25 (48): 11194-200
- 124 Squire, L. The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol.* 1987; 88; 21-22: 218-22
- 125 Squire, L. Structure and function of declarative and nondeclarative memory system. *Proc Natl Sci USA* 1996; 93:13515-13522
- 126 Squire, L., Clark, RE & Knowlton, BJ. Retrograde amnesia. *Hippocampus.* 2001; 11(1): 50-5. Review
- 127 Stupien, G., Florian, C and Roullet, P. Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice *Neurobiology of Learning and Memory* 2003; 80:32–41
- 128 Sutherland, RJ & Rodriguez, AJ. The role of the fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behav Brain Res* 1989; 32: 26577
- 129 Taube, JS., Muller, RV & Ranck, JB. Head direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *J Neurosci* 1990; 10: 436-47

- 130 Tanaka, C & Nishizuka, Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 551-567
- 131 Tarsa, L. & Yukiko, G. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *PNAS* 2000; 99: 1012-1016
- 132 Thomas, L., Hartung, K., Langosch, D., Rehm, H., Bamberg, E., Franke, WW & Betz, H. Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science*. 1988; 242: 1050–1053
- 133 Trimble, WSH & Séller, RH. Molecular biology of synaptic vesicle-associated proteins. *Trends. Neurosci.*, 1988; 11:241-242
- 134 Turner, KM., Burgoyne, RD & Morgan, A. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci* 1999; 22: 459-464
- 135 Valtorta, F., Benfenati, F & Greengard, P. Structure and function of the synapsins. *J Biol Chem* 1992; 267: 7195-7198
- 136 Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi D & Benfenati, F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bio Essays* 2004; 26: 445–453
- 137 Van der Zee, EA., Compaan, JC., Bohus, B & Luiten, PG. Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine spatial and colocalized PKC γ in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *Hippocampus* 1995; 5: 349–362
- 138 Van Der Zee, EA., Bas, R & Douma, K. Historical Review of Research on Protein Kinase C in Learning and Memory. *Pmg Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 1997a; 21: 379-406

- 139 Van Der Zee, E.A., Luiten, PG & Disterhoft, JF. Learning-Induced Alterations in Hippocampal PKC-Immunoreactivity: A Review and Hypothesis of its Functional Significance. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 1997b; 21: 531-572
- 140 Van der Zee, EA & Luiten, PG. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol.* 1999; 5:409-71. Review.
- 141 Walworth, NC., Gound, B., Kabcenell, AK & Novisk, PJ. Mutational analyzed of SEC4 suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *EMBO J* 1989; 8; 1685 – 1693
- 142 Waters, J. & Smith, SJ. Phorbol esters potentiate evoked and spontaneous release by different presynaptic mechanisms. *J Neurosci* 2000; 20: 7863-7870
- 143 Wick, MR. Immunohistology of neuroendocrine and neuroescodermal tumors. *Semin Diagn Pathol* 2000; 17: 194 – 203
- 144 Wiener, SI., Paul, CA & Eichenbaum, H. Spatial and behavioral correlates of hippocampal neuronal activity. *J Neurosci* 1989; 9: 2737-63
- 145 Wu, XS & Wu, LG. Protein kinase C increases the apparent affinity of the release machinery to Ca²⁺ by enhancing the release machinery downstream of the Ca²⁺ sensor. *J Neurosci* 2001; 21: 7928-7936
- 146 Wuarin JP, Dudek FE. Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. *JNeurosci* 1996; 16: 4438-48

147 Zhao, W., Garry, L., Sedman, Gibbs, M.E. & Kim, TNg. Effect of PKC inhibitors and activators on memory. Behavioral Brain Research. 1999; 60: 151-160

Zhao, W., Meiri, N., Xu, H., Cavallaro, S., Quattrone, A., Zhang, L. & Alkon, DL. FASEB J 2000; 14: 290–300