

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**Participación de los receptores muscarínicos en el área CA3 de  
hipocampo durante la formación de la memoria espacial.**

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
PRESENTA  
**WENDY VERÓNICA HERRERA MORALES**  
**TUTOR: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Es importante agradecer a quienes hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación recibida, por la maravillosa gente que he conocido en ella y por permitirme sentir lo que “alma mater” significa.

Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM; particularmente al laboratorio de aprendizaje y memoria a cargo del Dr. Federico Bermúdez-Rattoni con quien tuve la oportunidad de reiniciar y concluir mis estudios de doctorado.

A mi comité tutorial, Dra. Leticia Verdugo y Dra. Martha Escobar por su apoyo e interés para mejorar esta tesis.

A las biólogas Ivonne Mar y Bárbara Serrano por su participación, apoyo y sobre todo su entusiasmo en la colaboración de este trabajo.

A la Dra. Leticia Ramírez y el Biol. Luis Nuñez por su ayuda y discusión de las ideas a desarrollar.

A Federico Jandete por su asistencia técnica y a Oreste Carbajal por su apoyo en el laboratorio.

A los sinodales: Dra. Elvira Galarraga, Dra. Leticia Verdugo, Dr. Federico Bermúdez, Dr. Oscar Prospéro, Dr. Roberto Prado, Dr. Julio Morán y Dr. Ricardo Tapia por la revisión y enriquecimiento de la tesis.

A Sara Noguera y Adriana Morales por su trato tan amable y su cordial ayuda.

Agradezco el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por las becas que se me otorgaron, así como a los apoyos financieros para el proyecto de parte de CONACyT 42657-Q Y DGAPA PAPIIT IN212503.

## **DEDICATORIAS**

**A mi madre, Amparo, por su dedicación, amor, apoyo incondicional pero sobre todo por su admirable humanidad y fortaleza ante la vida.**

**A mi padre, Agustín, por respetar mis decisiones y depositar su confianza en mí.**

**A Andrea Herrera (Arraca) gracias por ser una excelente amiga y convertirme en una verdadera hermana.**

**A Luis Nuñez muchísimas gracias por compartir este camino con risas, tristezas, descubrimientos y ayudarme a ser un mejor ser humano.**

**A Miguel López (Tío Bonito) por enseñarme y guiarme en tantas cosas desde mi infancia y por tu reconfortante confianza en mí.**

**A Manuel Hernández y Guillermo Luna por todos los “problemas” en los que me ayudaron pero de sobremanera por su valiosa amistad.**

**Al Dr. Oscar Próspero por ser un ejemplo del amor y dedicación en la búsqueda del conocimiento pero sobre todo por sus sabias y reconfortantes pláticas.**

**Al Dr. Rafael Salin por su invaluable ayuda durante la etapa más difícil de este camino.**

**A las chicas “water maze”, Ivonne y Bárbara por la confianza que depositaron en mí pero sobre todo por su amistad.**

**A mis amigos y compañeros del laboratorio Royero, Rodrigo, Lety, Ilse y Kioko por compartir tantas vivencias.**

**A Rocío Rámila por ser una luz en la oscuridad.**

**A Claudia Castillo, gracias por tu amistad y ayuda a lo largo de los años a pesar de la distancia.**

**A Candy Hanks por ser la otra oveja negra.**

*“Lo que importa verdaderamente en la vida  
no son los objetivos que nos marcamos,  
sino los caminos que seguimos para lograrlo”*

*P. Bamm*

*“Llegar muy lejos siempre  
significa volver”*

*Lao Tse*

## RESUMEN

El hipocampo es una estructura del sistema límbico cuya participación en memorias declarativas ha sido ampliamente estudiada. En el caso de la memoria espacial se ha demostrado que esta estructura tiene una participación fundamental tanto en la formación de mapas espaciales, como en la resolución de laberintos y la formación de memorias espaciales. Muy particularmente, en el área CA3 del hipocampo se ha observado un incremento sustancial en la densidad sináptica tras el sobreentrenamiento de una tarea espacial en el laberinto acuático de Morris. Sin embargo, si bien el resultado anterior sugiere una participación preponderante del área CA3 en el aprendizaje espacial, los mecanismos a través de los cuales participa esta estructura no han sido descritos.

En la presente tesis encontramos que el sistema colinérgico es necesario para la adquisición del aprendizaje que permite la resolución del laberinto acuático de Morris. Posteriormente distinguimos la participación de diferentes subtipos de receptores muscarínicos en CA3 en la formación de la memoria espacial, y encontramos que particularmente el subtipo postsináptico M1 es fundamental para la consolidación, pero no para la adquisición de esta tarea. Encontramos también que el bloqueo de los receptores postsinápticos M3 y los presinápticos M2 no produce ningún efecto sobre la adquisición o consolidación de la memoria espacial.

En cuanto a las vías de señalización intracelular en las neuronas de CA3 involucradas en el aprendizaje espacial, encontramos que la inhibición de PKC produce un efecto muy similar al encontrado tras el uso de antagonistas de los receptores M1, lo que sugiere que entre los mecanismos activados por este receptor en CA3 durante el aprendizaje espacial se encuentra PKC.

Posteriormente, nos enfocamos a averiguar si los mecanismos descritos en CA3 que participan en el aprendizaje espacial, también están involucrados en la sinaptogénesis que el sobreentrenamiento en dicha tarea produce en esta área del hipocampo, estudiando el fenómeno por medio de la detección mediante Western Blot de una proteína de vesículas sinápticas, la sinaptofisina. Encontramos que tanto el uso de antagonistas al receptor M1 como la inhibición de PKC producen una disminución en la expresión de sinaptofisina en CA3.

Los resultados de la tesis son discutidos en términos de la función de CA3 en la formación de una memoria a corto plazo de duración mayor a la promedio, dependiente de la actividad de los receptores muscarínicos y de PKC. Por otra parte, se discute la relevancia de estos dos mecanismos en la sinaptogénesis observada en CA3, siendo esta dependiente de la consolidación de la tarea espacial.

## ABSTRACT

The hippocampus is a limbic structure whose participation in declarative memory formation has been widely studied. In the case of spatial memory, it has been shown that this structure has a fundamental participation in the formation of spatial maps, as well as in the resolution of mazes and the formation of spatial memories. An important increase in the synaptic density after overtraining in the Morris Water Maze has been observed particularly in the hippocampal CA3 area. However, while the aforementioned data suggests an important participation of CA3 in spatial learning, the biochemical mechanisms through which CA3 participates in spatial learning have not yet been described.

In the present thesis, we found that the cholinergic system is of crucial importance for the acquisition of skills to resolve the Morris water maze. Moreover, we defined the participation of different subtypes of muscarinic receptors in CA3 in the formation of spatial memory, and we found that particularly the postsynaptic M1 subtype is fundamental for the consolidation but not for the acquisition of this task. We also found that the blockade of postsynaptic muscarinic receptor M3 or of presynaptic M2 receptor had no effect on neither acquisition nor consolidation of the spatial memory.

Regarding the intracellular pathways in CA3 involved in spatial learning, we found that PKC inhibition produces a similar effect as antagonizing M1 receptor, suggesting that among the mechanisms activated by M1 in CA3 during spatial learning, PKC signaling is one of them.

I have also focused on finding whether the mechanisms described in CA3 participating in spatial learning, are also involved in the synaptogenesis produced in this area by the overtraining of a spatial task. I studied synaptogenesis by evaluating synaptophysin by western blot. We found that both M1 receptor antagonism, as well as PKC inhibition produce a decrease in synaptophysin expression in CA3.

The results of this thesis are discussed in terms of the role of CA3 in the formation of a short-term memory whose duration exceeds the average. I also discuss its dependency on the activation of muscarinic receptors and PKC. Moreover, the relevance of these two mechanisms in the synaptogenesis observed in CA3 are also discussed. Ultimately, I discuss if the consolidation of a spatial task depends on the synaptogenesis observed in the CA3 region.

# INDICE

Agradecimientos	
Dedicatorias	
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
Indice.....	vii
Tabla de abreviaturas.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Aprendizaje y memoria.....	1
1.1.- Sistemas de memoria.....	2
1.2.- Memoria declarativa y no declarativa.....	3
1.3.- Memoria espacial.....	5
2.- Hipocampo.....	6
2.1.- CA3.....	8
3.- Sistemas de neurotransmisión.....	10
3.1.- Acetilcolina (ACh).....	11
3.2.- Receptores muscarínicos.....	13
II..ANTECEDENTES.....	16
III..HIPOTESIS.....	21
IV..OBJETIVOS.....	22
Objetivos generales.....	22
Objetivos particulares.....	22
V. MATERIAL Y METODO.....	23
5.1.- Protocolo Conductual.....	23
5.1.1.- Animales.....	23
5.1.2.- Cirugía.....	23
5.1.3.- Procedimiento conductual.....	24
5.1.4.- Microinyección y fármacos.....	25
5.1.5.- Histología.....	26
5.1.6.- Análisis estadístico.....	26
VI. RESULTADOS.....	27
6.1.- Efecto del bloqueo no selectivo de los mAChR en CA3 durante el aprendizaje del laberinto acuático.....	27
6.1.1.- Bloqueo de los receptores muscarínicos previo al entrenamiento.....	27
6.1.2.- Bloqueo de los receptores muscarínicos posterior después al entrenamiento.....	29

6.2.- Efecto del bloqueo selectivo de los mAChR presinápticos o postsinápticos en CA3 sobre el aprendizaje espacial y la MLP en el laberinto acuático.....	30
6.3.- Bloqueo de mAChR presinápticos + bloqueo de mAChR postsinápticos.....	32
VII. Planteamiento de la 2ª hipótesis.....	35
VIII. Antecedentes de la 2ª hipótesis.....	37
8.1.- Proteínas de la vesícula sináptica.....	37
8.2.- Sinaptofisina.....	39
IX.- MATERIAL Y METODO.....	42
Protocolo Bioquímico.....	42
9.1.- Animales y cirugía.....	42
9.2.- Procedimiento conductual, microinyección y fármacos.....	42
9.3.- Extracción de la muestra y homogenización.....	42
9.4.- Cuantificación de proteínas.....	43
9.5.- Western Blot.....	43
9.6.- Análisis de placas fotográficas y de membranas.....	44
9.7.- Análisis estadístico.....	44
9.7.1.- Protocolo Conductual.....	44
9.7.2.- Protocolo Bioquímico.....	45
X. RESULTADOS.....	46
10.1.- Determinación de la detección de sinaptofisina en CA3 como técnica para detectar la sinaptogénesis en esta área producida como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto de agua.....	46
10.2.- Efecto de la inyección de pirenzepina en CA3 sobre la expresión de sinaptofisina en dicha área como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto de agua.....	48
XI. Planteamiento de la 3ª hipótesis.....	51
XII. Antecedentes de la 3ª hipótesis.....	52
12.1 Proteína Cinasa C (PKC) .....	52
XIII. MATERIAL Y METODO.....	57
13.1 Animales y cirugía.....	57
13.2 Procedimiento conductual, microinyección y fármacos.....	57
13.3 Protocolo bioquímico .....	57
13.4 Análisis estadístico.....	57
13.4.1 Protocolo Conductual.....	57
13.4.2 Protocolo Bioquímico.....	57

XIV RESULTADOS.....	58
14.1 Efecto de la inhibición de la proteína cinasa C (PKC) en CA3 sobre el aprendizaje del laberinto acuático.....	58
14.2 Efecto de la inyección de queleritina en CA3 sobre la expresión de sinaptofisina en dicha área como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto acuático.....	58
XV DISCUSION.....	61
XVI CONCLUSIONES.....	69
XVII. REFERENCIAS.....	70
XVIII. Anexo (Artículo) .....	79

## Tabla de abreviaturas

Ach	Acetilcolina
ASM	Area septal medial
CA1	Cuerno de Ammon 1
CA3	Cuerno de Ammon 3
CaMK-II	Proteína cinasa dependiente de calcio/cadmodulina II
CBA	Cerebro basal anterior
CE	Corteza Entorhinal
CS	Colaterales de Schaffer
DAG	Diacilglicerol
GD	Giro Dentado
I.C.V.	Intra-cerebro ventricular
LTP	Potenciación a Largo Plazo (Long-Term Potentiation)
LTD	Depresión a Largo Plazo (Long-Term Depression)
mAChR	Receptor muscarínico de Acetilcolina
MCP	Memoria a Corto Plazo
MD	Memoria Declarativa
MLP	Memoria a Largo Plazo
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PS	Fostatidilserina
SL	Stratum Lucidum
SNARE	Complejo: syntaxina, SNAP-25 Y Sinaptobrevina
Syp	Sinaptofisina

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.- APRENDIZAJE Y MEMORIA.

Los conceptos de aprendizaje y memoria están relacionados de manera muy cercana y en conjunto, son propiedades del sistema nervioso que nos permiten adquirir, retener y evocar diferentes tipos de información (Squire y Mishkin, 1991). El aprendizaje es el proceso mediante el cual adquirimos nueva información o nuevos conocimientos del medio ambiente, lo que nos permite desenvolvemos y sobrevivir en un mundo de estímulos cambiantes. Para poder mantener esta información disponible en el cerebro y usarla en un futuro hacemos uso de la memoria, que es el conocimiento adquirido como producto de la experiencia (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcala, 2001) o la persistencia del aprendizaje en un estado que puede ser evocado más tarde (Squire, 1987).

Los primeros estudios sistemáticos sobre la memoria datan de 1885, año en que Hermann Ebbinghaus investigó qué cantidad de nueva información podía almacenar y qué tan rápido podía olvidarla. Estudiaba series de sílabas y observaba cuántas se podían recordar. Encontró que la memoria se establece gradualmente, pues el recuerdo de un mayor número de sílabas dependía del número de veces que se estudiaba la serie (Op. Cit., en Anderson 2001).

En 1890, William James propuso una clasificación sobre la memoria, según la cual existen dos formas de establecimiento: memoria primaria y memoria secundaria, que más tarde para Atkinson y Shriffrin en 1968 serían memoria de corto y largo plazo, respectivamente. Según este modelo, la memoria a corto plazo fue considerada como un sistema de almacenamiento temporal con poca información: la memoria a largo plazo es el conjunto de información y vivencias que son persistentes a través del tiempo, su duración puede ser semanas, años e incluso pueden permanecer para toda la vida (Atkinson y Shriffrin, 1968).

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 estructuras llamadas sinapsis; 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 en Almaguer-Melian y Bergado-Rosado, 2002).

Más tarde, Bliss y Lomo (1973) encontraron las primeras evidencias experimentales en apoyo a las suposiciones de Cajal, 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 eléctricos intensos de alta frecuencia (Bliss, T y Lomo, T., 1973). A este fenómeno se le denominó potenciación sináptica de largo plazo (LTP por sus siglas en inglés *Long-Term Potentiation*).

### **1.1 Sistemas de memoria**

Una clasificación de los sistemas de memoria que se ha propuesto de acuerdo a su duración a través del tiempo es la división de memoria a corto plazo (MCP) y a largo plazo (MLP). La memoria a corto plazo nos permite almacenar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo, que puede durar segundos, minutos u horas. Es una memoria frágil y transitoria que resulta muy vulnerable a cualquier tipo de interferencia. 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. Se puede dar lugar a la 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, 2001),

teniendo como resultado el establecimiento de una memoria a largo plazo (MLP), la cual nos permite almacenar información durante tiempo ilimitado. Esta puede durar meses o incluso años, siendo una memoria más estable, duradera y poco vulnerable a interferencias (McGaugh, et al., 1996).

Los estudios realizados sobre los sistemas de memoria incorporan tanto distinciones anatómicas como psicológicas. En este esquema, un sistema de memoria está definido por una serie de características operativas y por estructuras cerebrales y sus conexiones. Los sistemas de memoria conocidos tienen acceso a todas las modalidades sensoriales y todos los sistemas pueden alcanzar múltiples rutas de salida. De acuerdo a esto, un esquema de algunos de los sistemas de memoria más prominentes actualmente bajo estudio está clasificado en los sistemas de memoria: declarativa, de procedimientos, emocional y perceptual, considerándose los tres últimos como memorias no declarativas (Eichembaum, 2003).

## **1.2 Memoria declarativa y no declarativa**

La disociación entre memoria declarativa o explícita y no declarativa o implícita, está basada en estudios de animales experimentales así como de pacientes amnésicos y sujetos normales que muestran que la memoria de hechos y eventos es distinta de otros tipos de memoria (Squire y Kandel, 1999).

La memoria no-declarativa, es un tipo de memoria que al igual que otras, es adquirida por medio de la experiencia; sin embargo, su particularidad es que se expresa como un cambio en el comportamiento, no como un recuerdo narrable. Su expresión es en gran medida automática e “inconsciente”. La memoria no declarativa se divide en tres sistemas que son: el perceptual, el emocional y el de habilidades y procedimientos (Eichembaum, 2003), así como reflejos primarios de aprendizaje tales como la habituación, sensibilización y condicionamientos clásico y operante (Squire y Kandel, 1999). Su principal lugar

de almacenamiento radica en estructuras subcorticales, como el neocórtex (caudado y putamen) aunque también pueden estar involucradas otras estructuras corticales en particular, las denominadas áreas de asociación cortical (Morgado, 2005; Eichembaum, 2003).

La memoria declarativa (MD) incluye información de hechos, ideas y eventos y requiere del recuerdo consciente, ya sea como una proposición verbal o una imagen visual (Squire, 1993). Este tipo de memoria tiene como destacada peculiaridad el poder expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original. Se subdivide en memoria episódica o de eventos y semántica o de hechos. Su adquisición se relaciona con el sistema hipocámpal y otras estructuras del lóbulo temporomedial (Morgado, 2005; Eichembaum, 2003).

Un ejemplo muy conocido de la MD es el caso del paciente epiléptico HM, a quien le extirparon bilateralmente el hipocampo y otras regiones del lóbulo temporomedial (1953), lo que le produjo una grave amnesia anterógrada específica para aprendizajes relacionales, es decir, no era capaz de almacenar nueva información a largo plazo, por lo que él puede leer todos los días el mismo periódico como si fuese nuevo, no puede recordar personas que acaba de conocer o aprender un nuevo camino a su casa, es decir, H.M., presenta dificultades en las diferentes memorias declarativas, entre ellas, la memoria espacial, sin embargo, H.M. era capaz de adquirir memorias no declarativas (Milner, et al., 1998).

Uno de los modelos de memoria declarativa más estudiados es el aprendizaje espacial, mediante el cual un animal puede ubicarse en el espacio, lo que le permite ubicar las fuentes de comida, lugares donde se encuentran los depredadores, donde puede refugiarse de ellos, etc. Es decir, las pruebas conductuales de memoria espacial estudian un tipo de aprendizaje que resulta

fundamental para la sobrevivencia de un organismo y que es común para un gran número de especies animales, incluido el humano.

### **1.3 Memoria espacial**

La memoria espacial consiste en la relación espacio-temporal hecha por un organismo para ubicarse en un determinado lugar por medio de claves espaciales que le permitan ubicarse en dicho espacio. Es un tipo de memoria episódica y por lo tanto una memoria declarativa (Squire y Zola, 1996). Esta memoria se encuentra directamente relacionada con el área cerebral denominada hipocampo; en dicha estructura se han realizado diversos experimentos y se ha observado que la lesión de esta estructura y sus conexiones produce un déficit en la orientación espacial en primates humanos, no humanos y roedores (Morris, et al., 1982; Hollup, et.al., 2001).

Además de los trabajos realizados con el paciente H.M., se han hecho estudios en humanos donde se ha visto la participación del hipocampo en tareas espaciales, un ejemplo es el trabajo de Maguire, et al. (1998) , quienes mediante neuroimágenes tomadas a humanos con tomografía por emisión de positrones, mostraron 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.

Los estudios con lesiones en animales 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 (Morris, et al 1982; Sutherland y Rodriguez, 1989; Morris, et al., 1990) por lo que esta estructura cerebral es de gran importancia en el aprendizaje espacial y su consolidación.

## 2.- Hipocampo

El hipocampo es una estructura que pertenece al sistema límbico, que se encuentra en el lóbulo temporal y desde hace ya 50 años, se sabe que está implicada en algunas formas de memoria (Penfield y Milner, 1958). Se encuentra localizado en los hemisferios cerebrales bajo la neocorteza y se divide anatómicamente en dos regiones principales: el giro dentado y los cuernos de Ammón (CA1 – CA4). 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) y se sabe que está involucrado tanto en la memoria espacial como en la memoria explícita en humanos y animales (Eichenbaum 1999; Shapiro y Eichenbaum 1999).

Al hipocampo se le incluye en el sistema llamado formación hipocampal, en la cual se ubican además; el giro dentado, el subículum, el presubículum, el parasubículum y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989).

Esta estructura cerebral recibe dos fuentes de información: aferencias subcorticales, que proyectan del septum medial a través del fornix, y aferencias neocorticales que convergen en la corteza entorrinal llegando al hipocampo por la denominada vía perforante (Fig. 1). La corteza entorrinal recibe la mayoría de sus aferencias de las cortezas perirrinal y parahipocampal. La principal eferencia del hipocampo es el subículum, quien a su vez envía proyecciones a la corteza entorrinal. El hipocampo está formado por dos estratos compuestos morfológicamente por diferentes tipos de células que comprenden el giro dentado (GD), que consiste principalmente de células granulares y los cuernos de Ammon (CA), que se encuentran formados principalmente de células piramidales (Amaral y Witter, 1989). El giro dentado descansa inmediatamente por debajo de las células piramidales de la parte baja del cuerno de Ammon. El hilus es la región que se encuentra entre las dos hojas de células granulares del

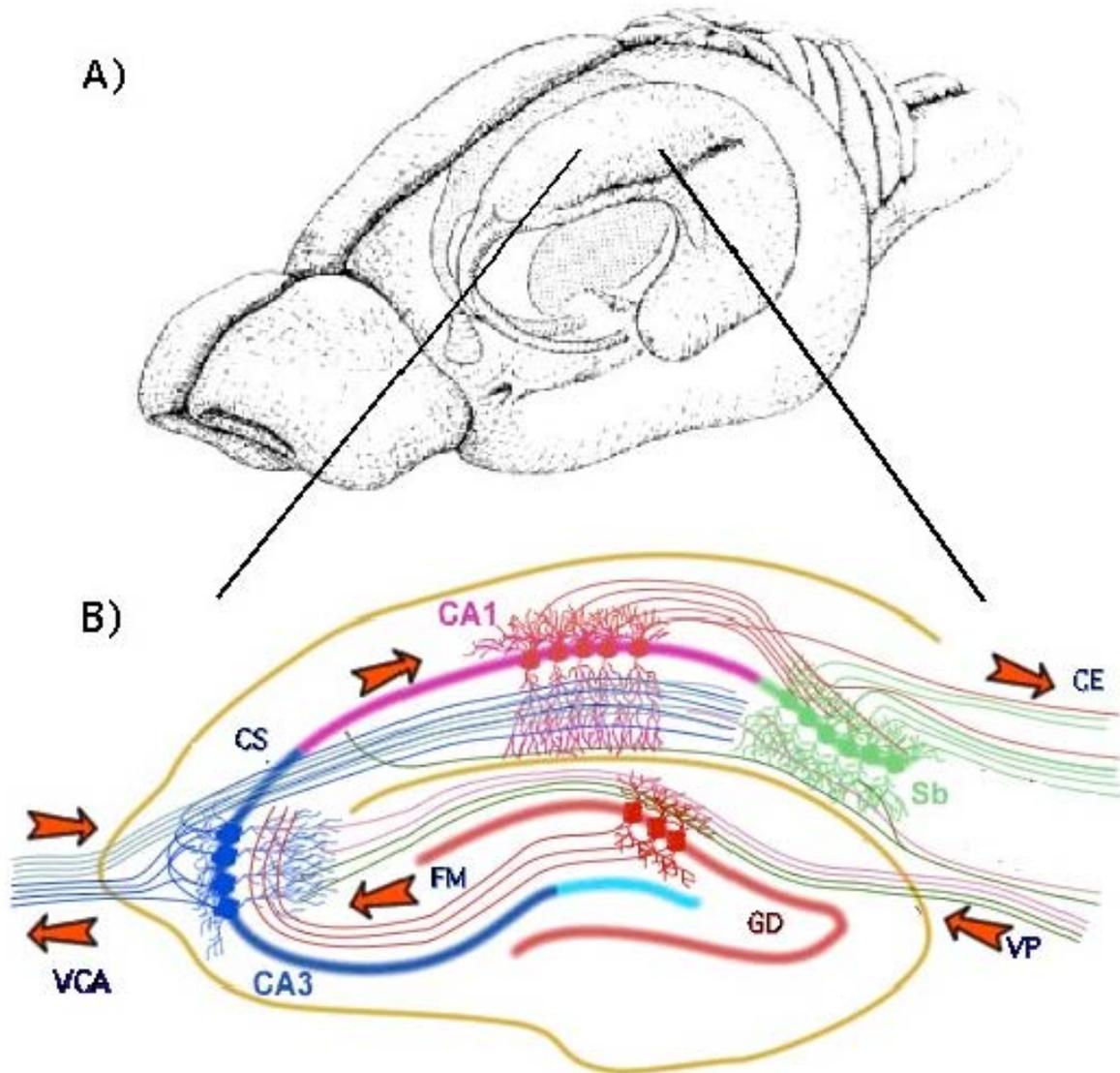


Figura 1: A) Cerebro de rata donde se puede observar los hipocampos de ambos hemisferios. B) Red hipocámpal: el hipocampo contiene una red mayoritariamente unidireccional con aferencias de la corteza entorrinal (CE) y forma conexiones con el giro dentado (GD) y las células piramidales de CA3 por medio de la vía perforante (VP). Las neuronas de CA3 también reciben aferencias del GD por las fibras musgosas (FM). Ellas mandan axones a las células piramidales de CA1 por medio de las colaterales de Schaffer (CS), así como a las células de CA1 en el hipocampo contralateral por la vía comisural de asociación (VCA). CA1 también recibe aferencias de la VP y envía axones al subículo (Sb). Estas neuronas a su vez envían la principal eferencia del hipocampo hacia la CE.

GD. Las subregiones de los cuernos de Ammon se numeran del 1 al 4 empezando desde la región más superficial y moviéndose alrededor hacia el hilus. CA1 y CA3 son fáciles de identificar histológica y fisiológicamente (Burges, et al., 1999). En la región de los cuernos de Ammón existe una subdivisión en donde la capa de célula piramidales se denomina *stratum pyramidale*, la zona basal de estas neuronas se nombra *stratum oriens*, y la zona apical se denomina *stratum lucidum* (Fig 2).

Como ya se mencionó, las aferencias al hipocampo son la corteza entorrinal y el subículum. La corteza entorrinal está compuesta de subdivisiones mediales y laterales y recibe información sensorial multimodal altamente procesada que se proyecta al giro dentado a través de la vía perforante. Esta información es enviada del giro dentado a los cuernos de Ammón de la siguiente manera: el conjunto de axones de las células granulares forman las fibras musgosas, las cuales forman una proyección hasta alcanzar a las células piramidales de la región CA3, los axones de las células piramidales de CA3 emiten colaterales, denominadas colaterales de Schaffer, que inervan a las células piramidales de CA1 (Amaral y Witter, 1989; Burges, et al, 1999). Las sinápsis entre corteza entorrinal con giro dentado, giro dentado con CA3 y CA3 con CA1, forman el circuito trisináptico del hipocampo (Fig. 1).

## **2.1 CA3**

Las células de CA3 han sido estudiadas ampliamente y se encuentran bien caracterizadas. Son poblaciones extensas de células piramidales y reciben aferencias de la vía perforante, así como de las células granulares del giro dentado a través de las fibras musgosas. Además de esta información externa que arriba a CA3, también recibe información de carácter interno de otras células de CA3 mediante las colaterales de asociación recurrentes (Amaral y Witter, 1989; Kandel et al., 1989).

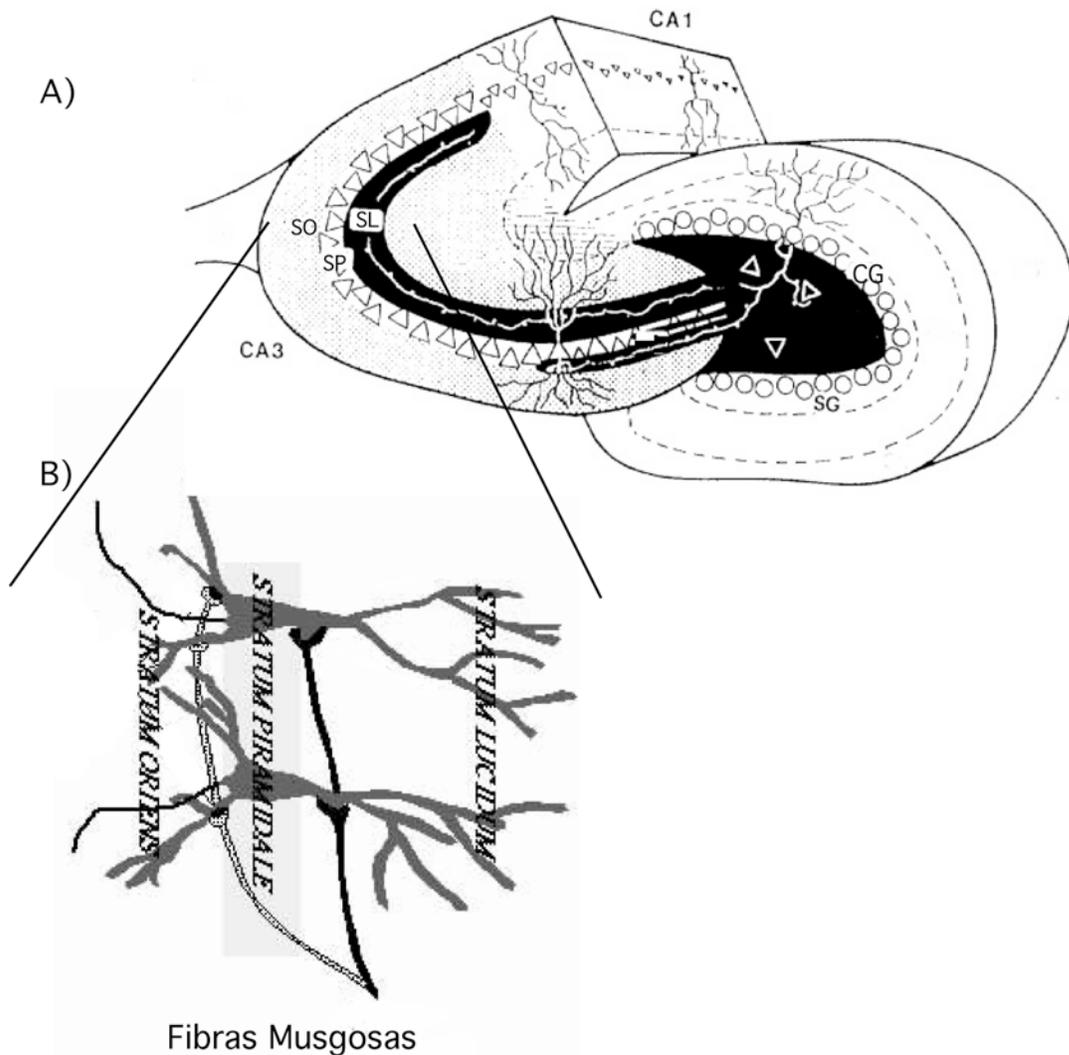


Fig 2. Ampliación de un corte coronal de hipocampo donde se muestra el área CA3 con sus subregiones; los *stratum lucidum* (SL), *pyramidale* (SP) y *oriens* (SO).

Debido a la organización 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 (Stupien, et al., 2003; Florian y Roulet, 2004).

En la mayor parte los aprendizajes asociativos se requiere de la asociación entre estímulos que generalmente se encuentran dispersos en el

tiempo, es decir, no son consecutivos. Dada la cantidad de conexiones recurrentes en el área CA3 del hipocampo, se ha sugerido que esta área tiene la capacidad de mantener estímulos en una especie de “memoria” mediante la activación reverberante de estas conexiones recurrentes (Wiebe et al, 1997), permitiendo que posteriormente sean asociadas a otros estímulos.

Otro fenómeno muy interesante que se ha observado en CA3 es la sinaptogénesis producida por cambios plásticos. La sinaptogénesis es la formación de nuevas sinápsis, y es un cambio plástico muy fuerte que se ha sugerido está relacionado a la consolidación de la memoria . Se ha encontrado que la inducción de LTP produce la generación de nuevas sinápsis en CA3 .

### **3.- Sistemas de Neurotransmisión**

En estudios recientes se ha demostrado que la participación de diferentes neurotransmisores que interaccionan entre si durante la formación de la memoria consecuentemente produce cambios a nivel sináptico, como variaciones en la eficiencia de la transmisión sináptica, y esto puede llegar a producir cambios morfológicos a nivel celular (Dudai, 1989; Bear, 1996; Rusakov, et al., 1997).

El hipocampo posee varios sistemas de neurotransmisión y recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales a través de su principal puerta de entrada, la vía perforante. Esta proyección es glutamatérgica y excitadora. Los receptores de glutamato han sido identificados como elementos importantes en los procesos de memoria y aprendizaje, así como en mecanismos de plasticidad como LTP y LTD (LTD por sus siglas en inglés *Long-Term Depression*), los cuales se piensa que son una de las bases celulares de algunas formas de aprendizaje. La actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) y de los receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) es esencial para la inducción y el mantenimiento de la LTP (Riedel y Reymann, 1996). El bloqueo del receptor tipo NMDA por medio de antagonistas tales como

el APV (ácido 2-amino-5- fosfonovalerico) daña la formación la memoria espacial y la LTP (Morris y Frey, 1997).

Existen otras proyecciones neuroquímicas al hipocampo como las noradrenérgicas originadas en el *locus coeruleus* y las serotoninérgicas originadas en el núcleo de *raphe* (Cassel, et al., 1997; Vizi y Kiss, 1998). En el hipocampo, estos dos sistemas de neurotransmisión, están implicados en la formación de las ondas theta ( $\theta$ ), que son un potencial generado por una población celular hipocampal, y su presencia está relacionada con el comportamiento exploratorio de los animales, movimientos cíclicos y durante el sueño MOR (movimientos oculares rápidos). La administración de un inhibidor de la síntesis de serotonina, la paraclorofenilalanina (PCPA), atenúa marcadamente las ondas theta y la administración de norepinefrina o de un agonista  $\alpha$ -2 adrenérgico al hipocampo suprime la ocurrencia de ondas theta (Mongeau, et al., 1997).

La participación, en procesos de aprendizaje, de los diferentes sistemas de neurotransmisión que arriban al hipocampo es amplia, otra de estas vías que es de gran importancia dentro de esta región es la colinérgica, la cual se origina principalmente en el área septo-medial (ASM) y en el núcleo de la banda diagonal de Broca vertical y horizontal (Cassel, et al., 1997; Vizi y Kiss, 1998). Este sistema de neurotransmisión está asociado a la modulación de varias funciones cognitivas (Dutar, et al., 1995), siendo primordialmente este sistema el que se ha identificado en los procesos de memoria y aprendizaje.

### **3.1 Acetilcolina (ACh)**

El sistema colinérgico es una de las vías mejor descritas en la literatura, sus proyecciones están bien definidas en primates humanos, no humanos y roedores. Esta vía se divide en dos grandes grupos. El primero se encuentra situado en el cerebro basal anterior (CBA), y se compone del área septal medial (ASM), el núcleo de la banda diagonal de Broca vertical y horizontal así como

del núcleo basal magnocelular (NBM), el cual en humanos recibe el nombre de núcleo basal de Meynert (Mesulam, et al. 1983). Y el segundo grupo distingue las neuronas que se encuentran en el tallo cerebral en la región del núcleo tegmental del pedúnculo pontino (PPTg) y el tegmentum pontino laterodorsal (Mesulam, et al., 1983; Rye, et al., 1987). Las células de este último grupo tienen principalmente proyecciones hacia el tálamo provenientes en su mayoría del PPTg, y las células colinérgicas del CBA inervan el manto cortical, la amígdala y el bulbo olfatorio (Naumann, et al., 1992; Ambrogi Lorenzini, et al., 1994). Además, las fibras de la rama rostral del CBA que se origina en el ASM y el brazo vertical de la banda diagonal de Broca viajan de manera caudal a través del fornix para finalmente inervar la formación hipocampal, así como las cortezas entorrinal y perirrinal. Las células blanco de las neuronas colinérgicas son principalmente las del giro dentado y los Cuernos de Ammon 1 y 3 (Naumann, et al., 1992).

Esta vía septo-hipocampal, recibe mayor atención en lo que se refiere a procesos cognitivos, se han realizado estudios de esta vía tanto en manipulaciones quirúrgicas como farmacológicas, y se sabe que gran parte de la actividad colinérgica del hipocampo es proveniente del ASM (Carlsen, et al., 1982; Amaral y Kurz, 1985). De la misma manera se ha propuesto que la integridad de esta vía es importante para llevar a cabo procesos relacionados con aprendizaje y memoria, atribuyendo principalmente la participación de la ACh en dichos procesos.

El sistema colinérgico presenta dos tipos de receptores: los muscarínicos (mAChR, por sus siglas en inglés muscarinic Acetylcholine receptor), acoplados a proteínas G y los receptores nicotínicos (N) asociados a canales iónicos. La liberación de ACh en el hipocampo durante el desempeño de una memoria espacial aprendida y el mejoramiento en la resolución de un laberinto radial ha sido correlacionado positivamente con el incremento en la liberación de este neurotransmisor durante los 12 días posteriores al entrenamiento (Fadda, et al.,

2000). Estos resultados muestran que el aprendizaje de una tarea espacial modifica la función de las neuronas colinérgicas que proyectan al hipocampo, las cuales comienzan a ser progresivamente más activas. En un paradigma conductual de orientación espacial, Van der Zee (1995) muestra que la discriminación espacial incrementa selectivamente la inmunoreactividad de los receptores muscarínicos en las células piramidales de CA1, sugiriendo la activación y aumento de los receptores muscarínicos en esta zona.

### **3.2 Receptores Muscarínicos**

Los receptores muscarínicos han sido considerados como algunos de los receptores reguladores de la plasticidad sináptica hipocampal (Shinoe, et al., 2005). Se conocen cinco subtipos distintos de receptores muscarínicos ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_5$ ), los cuales se encuentran distribuidos de manera diferencial en el hipocampo, siendo los de menor proporción, los  $M_5$  (van der Zee, et al., 1997; van der Zee y Luiten, 1999). Estos 5 tipos de mAChR se subdividen en postsinápticos y presinápticos. Los receptores postsinápticos ( $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$ ), se acoplan a una proteína G que activa a la Fosfolipasa C, mientras que los receptores presinápticos ( $M_2$  y  $M_4$ ), se acoplan a una proteína G que inhibe la adenilato ciclasa (Fig 3). Existe evidencia de que diversos subtipos de mAChR inhiben la liberación del glutamato, aspartato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y Ach (Raiteri, et al., 1984).

Estudios fisiológicos y farmacológicos han mostrado que los mAChR presinápticos en las terminales colinérgicas tienen un papel fundamental en la regulación de la liberación de ACh (Rouse S., et al., 2000). La estimulación de los mAChR presinápticos deprimen la transmisión excitadora, por ejemplo en las sinapsis entre las colaterales de Schaffer y CA1, y de las fibras musgosas a CA3. Mientras que los mAChR postsinápticos modulan la neurotransmisión sináptica excitadora adentro del hipocampo. Un ejemplo de esta modulación ha sido observada en CA1 por medio del aumento en la sensibilidad de los receptores NMDA consecuente a la activación de  $M_1$  (Marino, et al., 1998). Se

ha observado el aumento en la liberación de ACh durante la realización de diversos tipos de tareas así como el déficit que provoca su bloqueo en el aprendizaje y/o memoria de las mismas (Gold, 2003). Ejemplo de ello es la memoria espacial, dado que la inactivación de este sistema de neurotransmisión provoca el deterioro al aprendizaje y memoria de estas tareas dependientes del hipocampo (van der Zee, et al., 1995).

Por otro lado, Shinoe, et al., (2005) encontraron que la inyección a bajas concentraciones de un agonista colinérgico no selectivo, carbacol, así como la liberación endógena de acetilcolina por estimulación repetitiva a fibras colinérgicas, provocan un aumento en la respuesta eléctrica de LTP en la región CA1, es decir, el LTP inducido en las rebanadas hipocampales a las que se les aplicó uno de estos dos tratamientos (carbacol o estimulación de fibras colinérgicas) se ve mejorado con respecto al LTP inducido en las rebanadas que no fueron tratadas previamente. Posteriormente, estos autores, observaron que este efecto de mejora del LTP era dependiente de la actividad del receptor postsináptico M1, pero no del receptor postsináptico M3, ya que al realizar los mismos experimentos en rebanadas de animales “knock out” para el receptor M1 no se observó mejoría alguna en el LTP, mientras que en rebanadas hipocampales de animales “knock out” para el receptor M3 se observó el mismo efecto descrito en los animales silvestres, es decir, un mejoramiento en el LTP, 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<sub>1</sub>.

En el área CA3 en particular, se ha encontrado que la actividad intrínseca de las neuronas piramidales en esta área está regulada principalmente por el sistema colinérgico (Mizumori, et al., 1989), lo que sugiere un papel muy importante de estos receptores en los procesos plásticos en los que participa esta área.

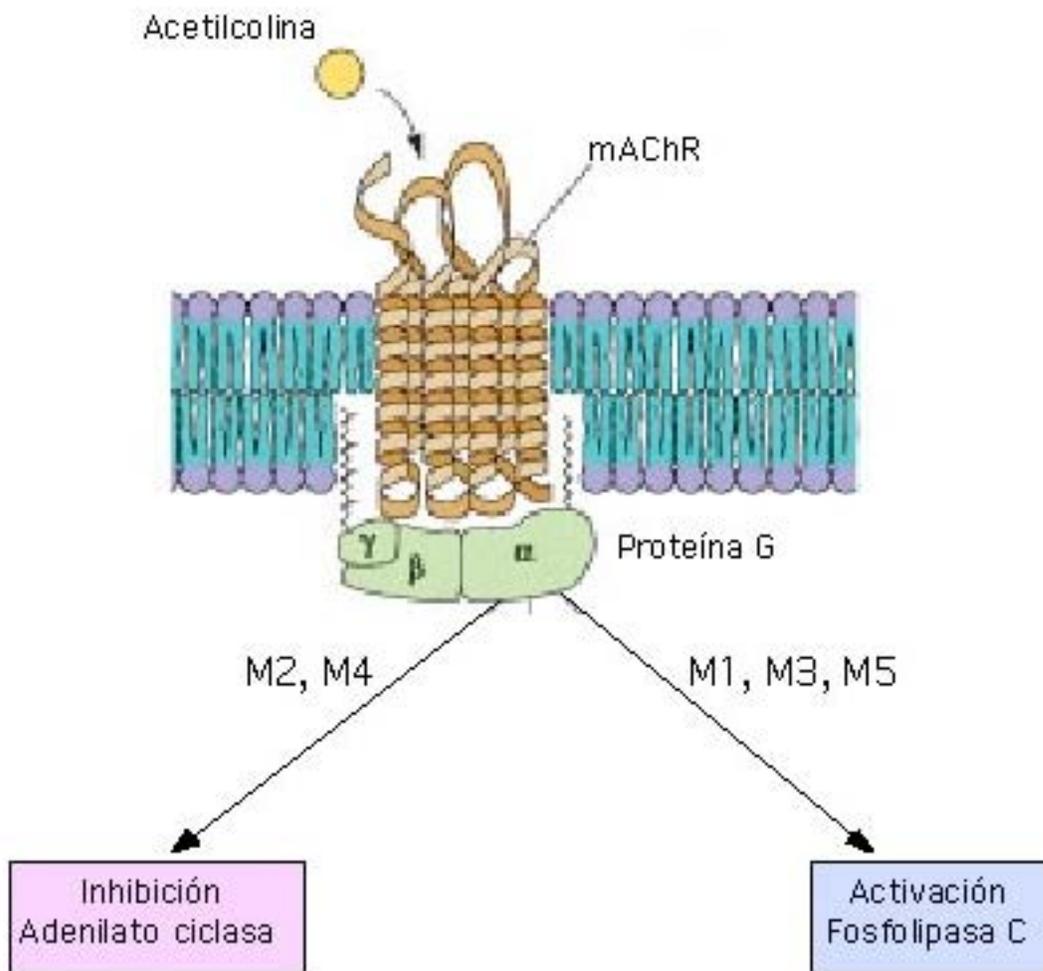


Fig 3. Esquema de los receptores muscarínicos (mAChR). Los 5 subtipos de mAChR (M1-M5) tienen 7 dominios transmembranales. Los mAChR postsinápticos M1, M3 y M5 se acoplan a proteínas G que activan la enzima fosfolipasa C y los presinápticos M2 y M4 se acoplan a proteínas G que inhiben la adenilato ciclasa.

## II. ANTECEDENTES

Uno de los objetivos en el campo de las neurociencias es entender los mecanismos neuronales involucrados en la codificación de la memoria. Se ha propuesto que el almacenamiento de la información en el cerebro, ocurre a través de cambios en la eficiencia de la comunicación sináptica, llamada plasticidad neuronal (Bliss y Collingridge, 1993). Existen evidencias de cambios morfológicos relacionados con la experiencia, los cuales han sido encontrados principalmente en el hipocampo. Además se han descrito cambios de larga duración en la eficiencia de la comunicación sináptica, inducida por la potenciación a largo plazo. La LTP ha sido investigada principalmente en el hipocampo y la neocorteza, donde probablemente residan las modificaciones que subyacen ciertas formas de aprendizaje y memoria. La estimulación de alta frecuencia utilizada para inducir LTP produce sinaptogénesis en las fibras musgosas hipocampales (Escobar, et al., 1997).

Se ha demostrado que la exposición de animales a ambientes enriquecidos induce cambios morfológicos en el hipocampo y la neocorteza, los cuales se supone facilitan la comunicación sináptica y la codificación del trazo de memoria (Moser, et al., 1994; Lendvai, et al., 2000). Finalmente hay varias demostraciones de la participación de señales moleculares en la regulación del aprendizaje y la memoria (Bailey y Kandel, 1993; Mayford, et al., 1995; Mansuy, et al., 1998). Sin embargo, a pesar de estos logros aún no está claro como es que ocurre la codificación de la memoria.

El trabajo de Greenough, et al., fue uno de los primeros en demostrar que los cambios morfológicos en el SNC de mamíferos pueden estar relacionados con la experiencia de un aprendizaje particular sugiriendo un vínculo entre la plasticidad morfológica y la formación de la memoria (Greenough, et al., 1978; Greenough, et al., 1985).

Se ha sugerido que en el hipocampo ocurren cambios sinápticos después del aprendizaje espacial (Rusakov, et al., 1997). Moser observó que la ramificación dendrítica ocurre después de exponer animales a un ambiente enriquecido y este tratamiento facilita el posterior aprendizaje de una tarea espacial (Moser, et al., 1994). Estudios realizados *in vitro* indican que la estimulación de alta frecuencia, necesaria para el establecimiento de LTP, en las fibras musgosas aumentan la movilidad de terminales presinápticas. Esta movilidad, que es considerada necesaria para la sinaptogénesis, es disminuida por antagonistas glutamatérgicos de tipo no-NMDA (N-metil-D-aspartato) mientras que los antagonistas tipo NMDA no interfieren en el proceso (McKinney, et al., 1999; De Paola, et al., 2003).

Para producir modificaciones morfológicas, la actividad molecular debe conducir a cambios en las proteínas de las neuronas durante los procesos de adquisición y consolidación de la memoria. Existen diversos estudios que usan una variedad de modelos dependientes de actividad que muestran cascadas moleculares involucradas en la formación de la memoria. En trabajos realizados con el modelo de LTP, tareas de prevención pasiva, laberinto acuático de Morris y condicionamiento aversivo a sabores, han encontrado que la progresión en la formación de la memoria requiere una participación temprana de receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA y receptores metabotrópicos regulados por transmisión colinérgica y gabaérgica (Izquierdo, et al. 1999; Ramirez-Amaya, 2001; Ferreira, et al., 2002). La activación de receptores muscarínicos inicia una serie de cascadas moleculares como la fosforilación de subunidades del receptor NMDA (Rosenblum, et al., 1996; Roseblum, 1997). Por el contrario, inhibidores de tirosinas cinasas y knockout de los genes para tirosinas cinasas bloquean la inducción de la LTP y la formación de memorias aversivas (Houpt y Berlin, 1999; Minichiello, et al., 1999). Estos resultados sugieren que diferentes cascadas de transducción de señales en la neurotransmisión son necesarias para la formación normal de la memoria, y probablemente la promoción de cambios morfológicos implicados en ésta (Woolf, 1998).

En nuestro laboratorio se ha propuesto un modelo de sobre-entrenamiento en ratas, que promueve los cambios plásticos hipocampales, los cuales podrían subyacer a la formación de la memoria. Se ha demostrado que el sobre-entrenamiento de ratas en el laberinto acuático de Morris induce sinaptogénesis en las fibras musgosas. Este cambio fue observado usando la tinción de Timm y microscopia electrónica (Ramirez-Amaya, et al., 1999). Además, se ha visto que las ratas sometidas a entrenamiento por varios días en el laberinto acuático de Morris ejecutan mejor la prueba de memoria realizada una semana y un mes después del entrenamiento y esta mejora se correlaciona con la densidad de las sinapsis de las fibras musgosas encontrada en CA3, en particular en el *stratum oriens* (Ramirez-Amaya, et al., 2001).

Adicionalmente, se ha demostrado que inyecciones intraperitoneales a bajas concentraciones de MK801 (antagonista de los receptores NMDA) aplicada inmediatamente antes de la adquisición, produce un claro bloqueo en la formación de la memoria. Sin embargo, la administración de MK801 inmediatamente después de la adquisición no produce ningún efecto en la memoria. La sinaptogénesis fue afectada sólo por la aplicación anterior a la adquisición pero no después de ésta (Ramirez-Amaya, et al., 2001).

Por otra parte se ha realizado una gran cantidad de estudios acerca de la función de la ACh en procesos cognitivos. En estos estudios, han utilizado inyecciones sistémicas o intracerebroventriculares (i.c.v.) de drogas que intervienen con el sistema colinérgico, o bien, se han provocado lesiones de este sistema para así examinar sus efectos sobre el comportamiento, memoria y aprendizaje. El uso de microinyecciones directamente al parénquima cerebral ha permitido que se examinen los efectos de drogas que incrementan o decrementan la función de la ACh en diferentes sistemas de memoria. Varios estudios indican que la inyección directa de agonistas o antagonistas en amígdala, estriado e hipocampo generalmente favorece o daña, respectivamente

el aprendizaje y la memoria en pruebas asociadas con estos sistemas neuronales (Carli, et al., 1997; Degroot y Parent, 2000).

Las manipulaciones farmacológicas del septum medial, frecuentemente asociadas con marcadores de ACh y sus funciones en el hipocampo, apoyan la idea de que un aumento o un decremento en las funciones del hipocampo mejora o deteriora el aprendizaje y memoria, respectivamente (Durkin, 1992; Degroot y Parent, 2000). Además, las lesiones electrolíticas o neurotóxicas en el septum medial resultan en un daño severo en la memoria y el aprendizaje en tareas relacionadas con el hipocampo (Gold, 2003). En diversos estudios se ha visto que el aumento o disminución en la liberación de ACh en el hipocampo está estrechamente relacionado con el efecto de la mejora o el daño sobre el aprendizaje y la memoria (Ragozzino y Gold, 1995; Ragozzino, et al., 1998).

Cuando se administra sistémicamente escopolamina, que es un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, se produce amnesia para diversas tareas conductuales en ratas, sugiriendo la participación de la transmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos en el proceso de memoria y aprendizaje. Cuando la escopolamina es inyectada directo en el hipocampo inmediatamente después del entrenamiento causa amnesia retrograda, revelando una participación activa de los receptores muscarínicos en esta estructura para la consolidación del trazo de memoria (Ferreira, et al., 2003). Existe una creciente evidencia acerca de la influencia de los tratamientos colinérgicos sobre la memoria vía receptores muscarínicos, proponiendo que estos son un componente crítico en la modulación de la consolidación de la memoria (Power, et al., 2003).

Recientemente se ha observado que dentro del sistema colinérgico los receptores muscarínicos tienen una función muy importante en memoria. El sistema de neurotransmisión colinérgico en el hipocampo ha sido estudiado mediante diversas tareas de memoria y aprendizaje por ejemplo, Shinoe, et al.,

(2005), sugieren que la liberación fisiológica de ACh desde las fibras colinérgicas modula la plasticidad sináptica hipocampal a través de la activación de receptores post-sinápticos M1 y que la modulación fisiológica de LTP por acción de ACh podría ser el primer paso en la facilitación de la formación de la memoria en el hipocampo siendo el receptor muscarínico M1 el que está participando de forma importante en este proceso (Shinoe, et al., 2005).

La hipótesis de que el receptor subtipo M1 participa en el almacenamiento de la memoria está sustentada por trabajos que muestran que las inyecciones i.c.v. o en hipocampo dorsal de un antagonista de receptores M1, pirenzepina, daña la expresión de diferentes respuestas condicionadas (Caufield, et al., 1983; Messer, et al., 1990; Sala, et al., 1991; Ohno, et al., 1994).

En resumen, el hipocampo, particularmente el área CA3, está estrechamente relacionada en el procesamiento y almacenamiento de la memoria espacial. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos neuroquímicos que subyacen la participación de esta área en el aprendizaje espacial. Dada la importancia de los receptores muscarínicos, su amplia presencia en esta estructura cerebral, así como su participación en eventos plásticos tales como LTP y sinaptogénesis, se desarrolló un protocolo para poder observar la participación de dichos receptores durante la adquisición y/o consolidación de una memoria espacial.

### **III. HIPOTESIS**

1.- El bloqueo de los receptores muscarínicos en el área CA3 del hipocampo provocará un déficit en los procesos de adquisición y/o consolidación de la memoria espacial.

## **IV. OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

Determinar la participación general y específica de los receptores muscarínicos en el área CA3 del hipocampo durante la adquisición y/o consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

### **Objetivos Particulares**

Evaluar y determinar la participación de todos los receptores muscarínicos, mediante el uso del antagonista no selectivo, escopolamina, en el área CA3 durante la adquisición y/o consolidación de una memoria espacial.

Evaluar y determinar la participación de los receptores muscarínicos postsinápticos M1, mediante el uso del antagonista selectivo de los receptores M1, pirenzepina, en el área CA3 durante la adquisición y/o consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

Evaluar y determinar la participación de los receptores muscarínicos postsinápticos M3, mediante el uso de su antagonista selectivo 4-DAMP, durante la adquisición y/o consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

Evaluar y determinar la participación de los receptores muscarínicos presinápticos con AFDX-116, antagonista de los receptores muscarínicos presinápticos M2 y M4, en el área CA3 durante la adquisición y/o consolidación de una memoria espacial.

## V. MATERIAL Y METODOS

En esta primera parte, se diseñó y realizó el protocolo conductual, para determinar el papel de los diferentes receptores muscarínicos en la región CA3 de hipocampo durante el aprendizaje y/o consolidación de una tarea espacial.

### 5.1 PROTOCOLO CONDUCTUAL

#### 5.1.1- Animales

Ciento cincuenta ratas macho cepa Wistar con peso entre 250 – 300 gr., al inicio del experimento, se colocaron en cajas individuales de acrílico. Los animales permanecieron en condiciones constantes de temperatura ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad, con comida y agua *ad libitum* y con un ciclo de luz-oscuridad invertido de 12-12 hrs (inicio de oscuridad a las 07:00 hrs). Los experimentos fueron realizados durante la fase oscura del ciclo, debido a que los roedores son animales de hábitos nocturnos por lo que su periodo de mayor actividad es en el ciclo de oscuridad.

#### 5.1.2.- Cirugía

Los animales se implantaron bilateralmente con cánulas de acero inoxidable de 9 mm., mediante un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA) bajo el efecto de anestesia (80 mg/Kg de hidrocloreuro de ketamina, y 12 mg/Kg de xilazina intraperitoneal).

La punta de las cánulas guía fueron colocadas 1.5 mm por encima de la región CA3 del hipocampo (AP = -3.0 mm; L =  $\pm 3.4$  mm; DV = -1.5 mm con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1986). Dichas cánulas fueron fijadas en el cráneo con cemento dental de acrílico y tornillos de acero inoxidable y finalmente se

colocó un obturador metálico para evitar que el conducto de las cánulas se tape. Los animales se mantuvieron en un periodo de recuperación post-operatorio de una semana y se manipularon una semana previa al inicio del experimento con la finalidad de habituarlos al contacto.

### **5.1.3.- Procedimiento conductual**

Los animales se entrenaron en un laberinto acuático de Morris, el cual consiste en una piscina circular de 163 cm., de diámetro y 69 cm., de alto, con paredes y piso de color negro. La piscina se llena de agua a 19°C y se coloca una plataforma sumergida 1 cm., debajo del nivel del agua, la cual se sitúa en el centro de uno de los cuatro cuadrantes de la piscina. La plataforma y las claves espaciales que se encuentran alrededor del laberinto se mantienen siempre en el mismo sitio durante todo el entrenamiento.

El entrenamiento de los animales en el laberinto consistió de 1 sesión diaria durante 4 días, las sesiones fueron de diez ensayos cada una. En cada ensayo el animal se colocaba en el laberinto empezando en 1 de 10 diferentes puntos posibles, al finalizar los 10 ensayos los animales eran colocados en el vivario. El tiempo total de cada ensayo para que los animales encontraran la plataforma es de 60 seg., o bien hasta que encontraran la plataforma; una vez en la plataforma, permanecían en ella por 30 seg., pasado ese tiempo se colocaban en una caja durante otros 30 seg., y posteriormente se continuaba con el siguiente ensayo hasta cubrir los 10 ensayos (Ver detalles en Nerad, et al., 1996).

Los trayectos que siguen los animales durante cada uno de los ensayos fueron grabados usando un sistema Chromotrack (San Diego Instruments), permitiendo obtener datos del recorrido como, latencia (tiempo que tardan los animales en llegar a la plataforma) y en el caso de la prueba de memoria a largo plazo, el número de veces que pasan los animales por donde se encontraba colocada la plataforma durante las sesiones de adquisición (número de cruces).

Una vez concluidos los cuatro días de entrenamiento, los animales permanecieron en el vivario durante 7 días. Pasado este tiempo se realiza la prueba de memoria a largo plazo, la cual consiste en un sólo ensayo de 120 segs., sin la plataforma dentro de la piscina. Durante esta prueba se miden, la latencia y el número de cruces.

#### **5.1.4.- Microinyección y Fármacos**

La microinyección bilateral en el área de CA3 del hipocampo se llevó a cabo por medio de microinyectores hechos de agujas dentales conectadas a tubo teflón y a una jeringa Hamilton de 10 µl montada en una bomba de microinfusión (Cole Parmer Instruments). Dichas agujas fueron guiadas a través de las cánulas implantadas bilateralmente en esta área del hipocampo. La tasa de inyección fue de 0.5 µl de la solución por hemisferio en 120s., una vez concluida la inyección se mantuvo la aguja durante un periodo de difusión de 120s. Las inyecciones se realizaron 20 minutos antes de iniciar o inmediatamente después de terminar el entrenamiento.

Con la finalidad de estudiar la participación de los diferentes receptores muscarínicos durante la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial, se utilizaron los siguientes 14 grupos con inyección previa al entrenamiento: Escopolamina 60 mg/ml (Hidrobromuro de escopolamina, Sigma, St. Louis, MO; Esc 60; n = 11); Escopolamina 30 mg/ml (Esc 30; n = 12); Pirenzepina 42.43 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO; Pir; n = 12); AFDX-116 0.2175 mg/ml (Tocris, Ellisville, MO, AFDX; n = 11); 42.43 mg/ml pirenzepina + 0.2175 mg/ml AFDX-116 (Pir + AFDX; n = 11); 2.1 µg/µl 4-DAMP (DAMP methiodide, Sigma, St. Louis, MO; DAMP 2.1; n = 8); 4.2 µg/µl 4-DAMP (DAMP 4.2; n = 6); vehículo (cada uno de los grupos mencionados tuvo su respectivo vehículo, con un total de 7 grupos vehículo) (Solución Ringer: 118 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O) (n total = 58).

Se tuvieron 2 grupos más con inyección posterior al entrenamiento: Escopolamina 60 mg/ml (Esc Desp; n =10); y su respectivo vehículo (Ring Desp; n = 11).

### **5.1.5.- Histología**

Una vez finalizados los experimentos conductuales los animales se perfundieron transcardialmente con solución salina al 0.9% y posteriormente solución de paraformaldehído al 4% (en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.4). Al finalizar, se extrajeron los cerebros y se colocaron en frascos individuales con paraformaldehido, después de dos semanas se colocaron en una solución de sacarosa al 15% y posteriormente al 30% hasta que los cerebros se asentaran en el fondo del frasco, finalmente se obtuvieron cortes coronales del tejido, mediante un crióstato, de 40µm y los cortes se tiñeron con violeta de cresilo para examinar la ubicación donde se encontraban las cánulas mediante microscopia de luz (10x).

### **5.1.6- Análisis Estadístico**

Los datos de las curvas de aprendizaje fueron analizados por medio de una ANOVA de medidas repetidas y una prueba *post hoc* de Fisher. Los datos de las pruebas de MLP fueron analizados por medio de una ANOVA factorial de una vía y una prueba *post hoc* de Fisher o una t de student no pareada, dependiendo del número de grupos.

## VI. RESULTADOS.

### 6.1 Efecto del bloqueo no selectivo de los mAChR en CA3 durante el aprendizaje del laberinto acuático.

#### 6.1.1 Bloqueo de los receptores muscarínicos previo al entrenamiento.

Como se observa en la figura 4A, el bloqueo no selectivo de los receptores muscarínicos en CA3 produce un déficit en la adquisición de la tarea al utilizar la dosis más alta (escopolamina 60), y un débil efecto con la dosis baja (escopolamina 30), ya que a lo largo de los 4 días de entrenamiento, el análisis estadístico ANOVA arrojó diferencias significativas entre los 3 grupos ( $F_{2,30}=30.105$ ,  $p<0.0001$ ), y hubo una diferencia significativa en el desempeño de los animales a lo largo de los días de entrenamiento ( $F_{39,30}=14.024$ ,  $p<0.0001$ ). Además, mediante una ANOVA de medidas repetidas de la latencia para alcanzar la plataforma durante los ensayos de adquisición, reveló diferencias significativas entre los grupos durante el día 1 ( $F_{2,30} = 4.87$ ;  $p < 0.05$ ) y para los días 2, 3 y 4 ( $F's_{2,30} = 13.69$ ;  $22.23$ ;  $18.78$ ;  $p's < 0.0001$  respectivamente). Una prueba *post-hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos escopolamina 60 y vehículo en el día 1, 2, 3 y 4 ( $p < 0.0001$ ); y entre el grupo escopolamina 30 y vehículo en los días 2 ( $p < 0.0001$ ), y para los días 3 y 4 ( $p < 0.01$ ).

Del mismo modo, como se muestra en la figura 4B durante la prueba de MLP se encontró diferencia significativa mediante una ANOVA de una vía, en la latencia entre grupos ( $F_{2,30} = 12.21$ ;  $p < 0.0001$ ). La prueba *post-hoc* de Fisher mostró diferencias significativas sólo entre grupos escopolamina 60 y vehículo ( $p < 0.0001$ ). También se encontraron diferencias significativas entre los grupos para el número de cruces ( $F_{2,30} = 12.31$ ;  $p < 0.0001$ ). La prueba *post-hoc* de Fisher mostró una diferencia significativa sólo entre el grupo escopolamina 60 y vehículo ( $p < 0.0001$ ), como se puede observar en la figura 4C. No se

encontraron diferencias significativas en la prueba de MLP entre el grupo escopolamina 30 y vehículo (Fig., 4B y C).

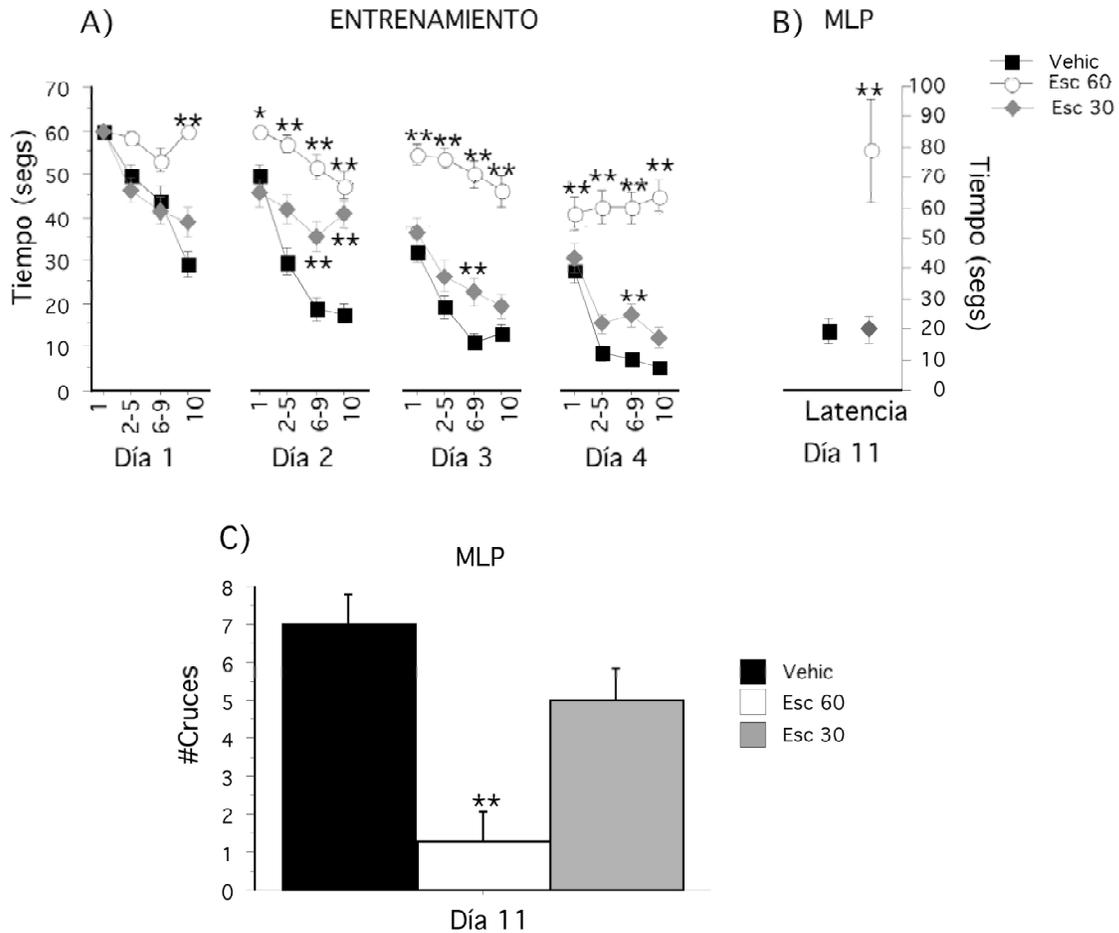


Figura 4.- Efecto de la inyección de escopolamina en el área CA3 de hipocampo en las dosis de 60mg/ml (Esc 60) y 30mg/ml (Esc 30), o vehículo (Vehic) antes del entrenamiento. A) Curva de aprendizaje de los cuatro días de entrenamiento, los puntos observados en la gráfica representan el primer y décimo ensayo así como el promedio de los ensayos 2 a 5 y 6 a 9 en cada uno de los días. B) Prueba de MLP medida por la latencia de llegada al área donde se encontraba la plataforma y C) el número de cruces.\* =  $p < 0.05$  y \*\* =  $p < 0.01$ .

### 6.1.2 Bloqueo de los receptores muscarínicos posterior al entrenamiento.

El bloqueo de los receptores muscarínicos en CA3 después del entrenamiento no produjo ningún efecto en la adquisición (Fig., 5A) ni en la formación de la MLP del laberinto de agua (Fig., 5 B y C).

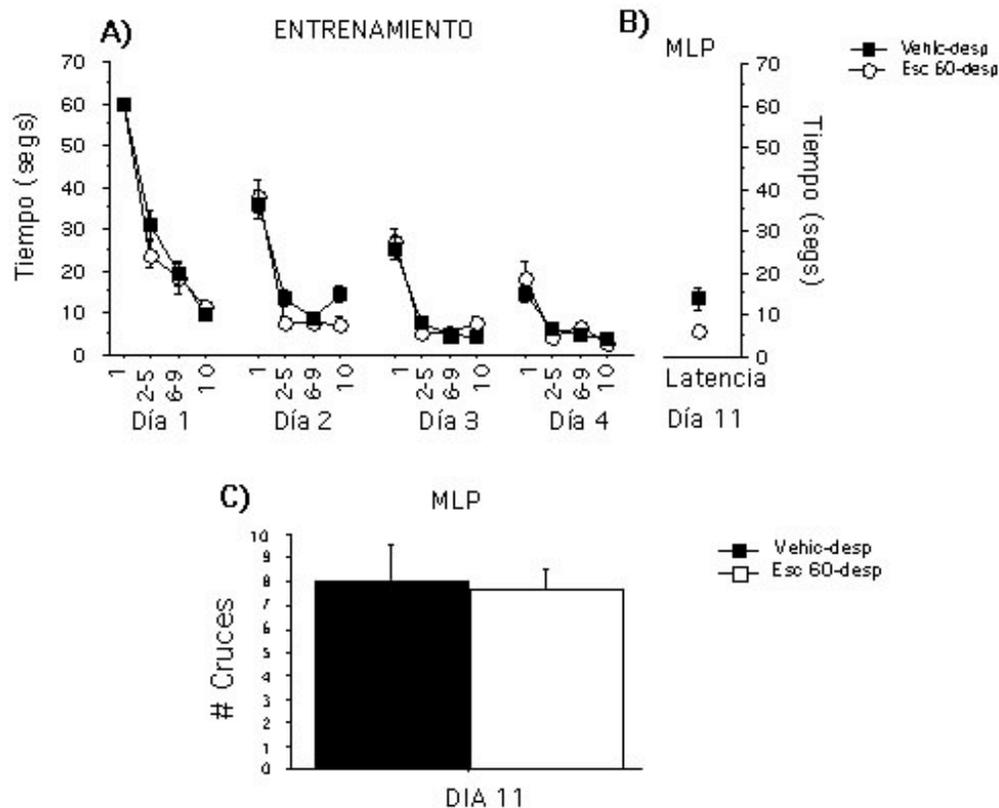


Figura 5.- Efecto de la inyección en el área CA3 de escopolamina (60 mg/ml, Esc 60-desp) o vehículo (Vehic-desp), después de cada día de entrenamiento. (A) Curva de aprendizaje de los 4 días de entrenamiento, los puntos observados en la gráfica representan el primero y décimo ensayo así como el promedio de los ensayos 2 a 5 y 6 a 9 en cada uno de los días. (B) Prueba de memoria a largo plazo medida por la latencia de llegada a donde estaba la plataforma y (C) el número de cruces por dicha área.

## **6.2 Efecto del bloqueo selectivo de los mAChR presinápticos o postsinápticos en CA3 sobre el aprendizaje espacial y la MLP en el laberinto acuático.**

Dado que la escopolamina es un antagonista no selectivo de receptores muscarínicos, no es posible determinar mediante este fármaco cual o cuales de los receptores muscarínicos está involucrado en el aprendizaje espacial, por lo que se decidió inyectar antagonistas selectivos para dichos receptores, se utilizó AFDX-116 para los receptores muscarínicos presinápticos M2 y M4; Pirenzepina para los postsinápticos M1 y 4-DAMP para los postsinápticos M3.

En este experimento, utilizamos pirenzepina para antagonizar los receptores M1, ya que en otros estudios se ha encontrado que son primordialmente estos los mAChR postsinápticos involucrados en procesos de plasticidad sináptica (Shinoe, et al. 2005; van der Zee y Luiten, 1999). Como se observa en la figura 6A, el bloqueo de los mAChR presinápticos con AFDX-116 así como el bloqueo de los postsinápticos M1, antes del entrenamiento, no produjeron ningún efecto sobre la adquisición de la tarea, aunque en el grupo tratado con AFDX se observó una tendencia no significativa a producir una mejora. Por otra parte, en la ejecución de la prueba de MLP, mediante una prueba ANOVA de una vía se encontraron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la latencia ( $F_{2,33} = 4.97$ ;  $p < 0.05$ ). La prueba *post-hoc* de Fisher mostró una diferencia significativa entre los grupos pirenzepina y vehículo ( $p < 0.01$ ) (Fig., 6B), además, se encontró diferencia significativa entre los grupos en el número de cruces ( $F_{2,33} = 4.72$ ;  $p < 0.01$ ), donde la prueba *post-hoc* de Fisher mostró diferencia significativa entre el grupo pirenzepina y el vehículo ( $p < 0.01$ ), como se puede observar en la figura 6C.

Adicionalmente, inyectamos dos diferentes dosis del antagonista de los mAChR postsinápticos M3 (4-DAMP). Como se observa en la figura 7, el bloqueo de los mAChR M3, antes del entrenamiento, no produjo ningún déficit en la adquisición (Fig., 7A) ni en la formación de la MLP (Fig., 7 B y C), con ninguna de las dosis

empleadas, lo que concuerda con trabajos anteriores donde se ha estudiado el papel de este receptor en plasticidad (Shinoe, et al., 2005).

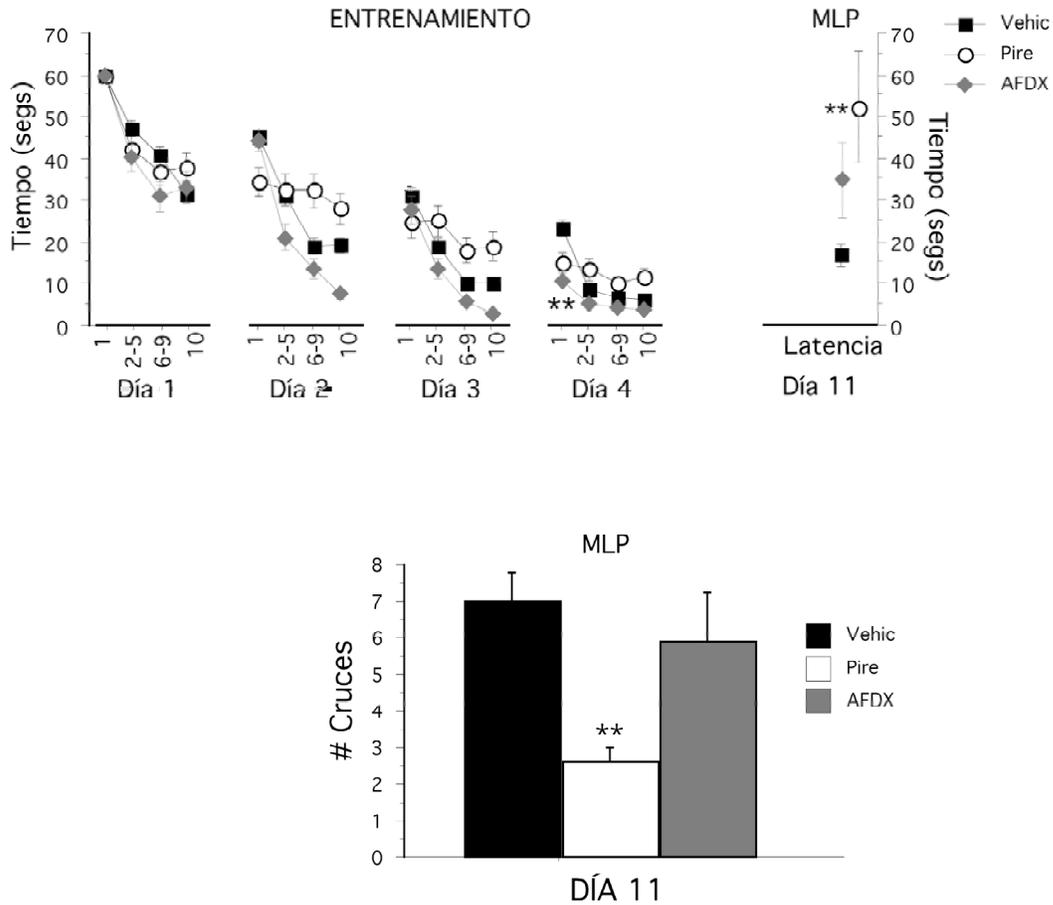


Figura 6.- Efecto de la inyección en CA3 de pirenzepina, AFDX-116 o vehículo antes del entrenamiento. (A) Curva de aprendizaje de los 4 días de entrenamiento, los puntos observados en la gráfica representan el primer y décimo ensayo así como el promedio de los ensayos 2 a 5 y 6 a 9 en cada uno de los días. (B) Prueba de memoria a largo plazo medida por la latencia de llegada a donde estaba la plataforma y (C) el número de cruces por dicha área. \*\*= $p < 0.01$

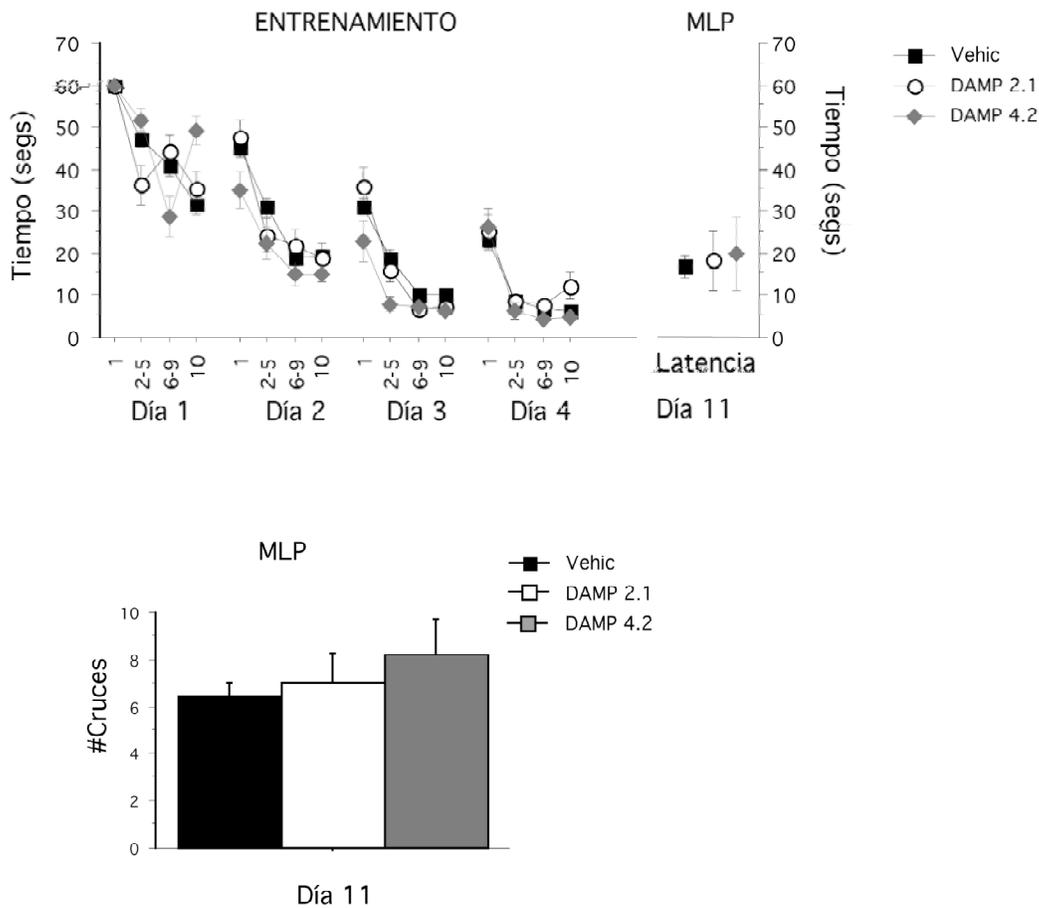


Figura 7.- Efecto de la inyección de 4-DAMP en el área CA3 en las dosis de 2.1 y 4.2 mg/ml, o vehículo antes del entrenamiento. (A) Curva de aprendizaje de los 4 días de entrenamiento, los puntos observados en la gráfica representan el primer y décimo ensayo así como el promedio de los ensayos 2 a 5 y 6 a 9 en cada uno de los días. B) Prueba de MLP medida por la latencia de llegada al área donde se encontraba la plataforma y (C) el número de cruces por dicha área.

### 6.3 Bloqueo de mAChR presinápticos + bloqueo de mAChR postsinápticos.

Como se observa en el apartado anterior, el bloqueo de los mAChR M1 con pirenzepina, es el único tratamiento de los utilizados en este trabajo que produjo un déficit en la formación de la MLP de la tarea espacial en el laberinto acuático. Sin embargo, dado que la inyección de escopolamina, que bloquea todos los subtipos de mAChR, produce un déficit en la adquisición de esta tarea, y por lo tanto en la formación de la MLP, es evidente que el efecto no fue reproducido por ninguno de los antagonistas utilizados para bloquear

selectivamente diferentes subtipos de mAChR. Esto produce la interrogante de si el déficit observado tras la inyección de escopolamina se debía a algún efecto inespecífico del fármaco o era producto de antagonizar más de un subtipo de receptor. Por lo tanto, se hizo un grupo en el cual se inyectó una mezcla que combinaba AFDX-116 (antagonista de mAChR presinápticos) y pirenzepina (antagonista de mAChR postsinápticos M1) con las dosis empleadas en los experimentos anteriores.

En la figura 8 se observa como la mezcla AFDX-116 + Pirenzepina produjo un déficit en la adquisición de la tarea. Mediante una ANOVA de medidas repetidas se encontró diferencia significativa entre los dos grupos ( $F_{1,23}=6.884$ ,  $p<0.05$ ), y una diferencia significativa a lo largo de los días de entrenamiento ( $F_{39,23}=13.649$ ,  $p<0.0001$ ). Además, una ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas entre los grupos durante los días 2 ( $F_{1,23} = 10.48$ ;  $p < 0.01$ ), 3 ( $F_{1,23} = 4.40$ ;  $p < 0.05$ ) y 4 ( $F_{1,23} = 11.06$ ;  $p < 0.01$ ). La prueba *post-hoc* de Fisher mostró diferencias entre los grupos en los días 2, 3 y 4 ( $p$ 's  $< 0.0001$ ; Fig., 8A).

En la ejecución de la prueba de MLP, se encontró diferencia significativa entre los dos grupos tanto en la latencia de llegada a la zona donde se encontraba la plataforma ( $F_{1,23} = 8.03$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig., 8B), como en el número de cruces por dicha área ( $F_{1,23} = 11.44$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig., 8C); de manera muy similar a la ejecución de los animales que fueron inyectados con escopolamina 60 antes del entrenamiento.

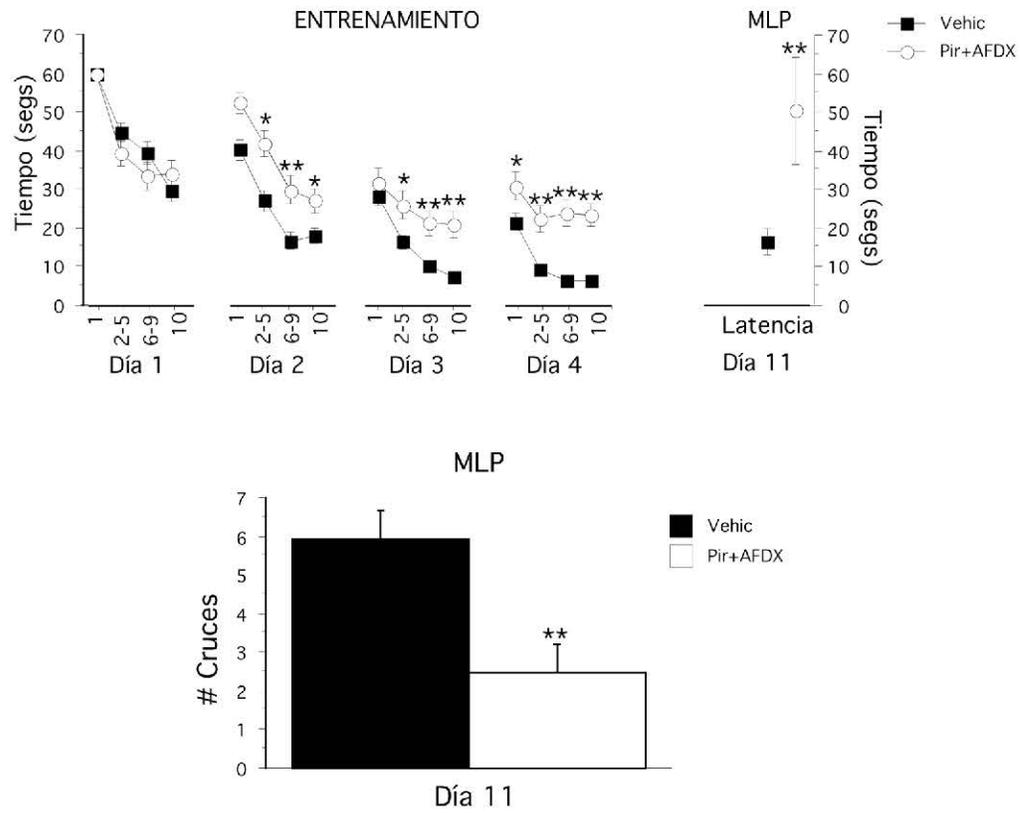


Figura 8.- Efecto de la inyección en el área CA3 de un cocktail de pirenzepina y AFDX-116 (Pir+AFDX), o vehículo (Vehic) antes del entrenamiento. (A) Curva de aprendizaje de los 4 días de entrenamiento, los puntos observados en la gráfica representan el primer y décimo ensayo así como el promedio de los ensayos 2 a 5 y 6 a 9 en cada uno de los días. (B) Prueba de memoria a largo plazo medida por la latencia de llegada a donde estaba la plataforma y (C) el número de cruces por dicha área.

## VII. PLANTEAMIENTO DE LA 2ª HIPOTESIS

Como se mencionó en la introducción, un evento plástico muy importante observado en CA3 es la sinaptogénesis producida por el sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris, donde encontraron que los animales presentaban un aumento en la densidad de las terminales de las fibras musgosas en el *stratum oriens* del área CA3 (Ramirez-Amaya, et al., 1999; Ramirez-Amaya, 2001). En estos trabajos se sugiere que dicho aumento de densidad sináptica es consecuencia del proceso de consolidación de la memoria espacial. Sin embargo, los tratamientos utilizados no permiten diferenciar claramente entre el proceso de adquisición y el de consolidación, ya que el uso de antagonistas a los receptores NMDA antes del entrenamiento provoca un déficit en la adquisición así como en la consolidación, y el bloqueo de estos receptores después del entrenamiento no provoca efecto alguno sobre el aumento de la densidad sináptica. Por otra parte, cabe mencionar que el antagonista de los receptores NMDA (MK-801) se inyectó de manera sistémica, lo que hace imposible determinar el sitio o sitios donde actuó el fármaco, dificultando la interpretación de los resultados y además la técnica que utilizaron, (tinción de Timm) les permite determinar la aparición de nuevas sinapsis en CA3, pero no permite saber si dichas sinapsis son funcionales.

Como se puede observar en secciones anteriores de esta tesis y de acuerdo a nuestros resultados, la inyección de pirenzepina (antagonista selectivo de mAChR M1) en CA3 antes del entrenamiento produce un severo déficit en la formación de la MLP del laberinto acuático de Morris (Fig., 6 B y C) sin afectar el proceso de adquisición (Fig., 6 A). Este hallazgo nos proporcionó un tratamiento farmacológico que nos permite diferenciar eficientemente el proceso de adquisición del de consolidación, definiendo además con precisión el efecto de dicho tratamiento en un área determinada CA3. De esta manera, la 2ª Propuesta de este trabajo fue determinar el efecto de la inyección de pirenzepina en CA3 sobre la sinaptogénesis producida en esta área como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris. Con la finalidad de

acercarnos más a la posible funcionalidad de estas sinapsis, evaluamos mediante un marcador bioquímico si la sinaptogénesis observada en CA3 por otros autores (Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001), está relacionada con alguno de estos dos procesos. Para ello, se utilizó como marcador de sitios sinápticos una proteína de membrana de las vesículas sinápticas, la sinaptofisina y mediante Western Blot observamos el cambio en la expresión de esta proteína en el área CA3 para así tener una aproximación a la posible funcionalidad de esta doble banda y si está relacionada con el proceso de adquisición o consolidación de manera particular.

## VIII. ANTECEDENTES DE LA 2ª HIPOTESIS

### 8.1.-Proteínas de la Vesícula sináptica

Las proteínas de vesícula sináptica pueden ser divididas en dos clases, correspondientes a dos principales funciones. La primera la conforman las proteínas de transporte y la segunda la conforman las proteínas ligadas al movimiento hacia un blanco y las reacciones de fusión y fisión de la vesícula al botón sináptico (Sudhof y Jahn, 1991). Las vesículas sinápticas deben navegar a través de la terminal nerviosa por medio del citoesqueleto; la interacción entre las vesículas sinápticas y el citoesqueleto está mediada por sinapsinas. Las sinapsinas son específicas para vesículas sinápticas en las neuronas y unen diversos elementos del citoesqueleto; sugiriendo un papel importante de la sinapsina en la regulación de la movilidad de las vesículas sinápticas hacia los sitios de liberación (Sudhof, 1989). Existen otras proteínas tales como Rab 3A la cual indica el sitio blanco en donde será liberado el neurotransmisor (Walworth, et al., 1989); sinaptotagmina que ayuda al anclaje y fusión de las vesículas (Pfenninger, et al., 1972); sinaptofisina que es una proteína integral de membrana que ha sido un magnífico candidato para la formación del poro para la exocitosis (Rahamimoff, et al., 1988); y algunas otras más como las sinaptobrevinas (Sudhof y Jahn, 1991) (Fig 9).

Las vesículas sinápticas 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).

El movimiento de las vesículas sinápticas hacia la zona activa de la presinápsis se produce por un proceso en el que interactúan proteínas de la pared de la vesícula (sinaptobrevina y sinaptotagmina) y de la membrana de la terminal (syntaxina y SNAP-25) (Fig 10). Algunos de estos componentes se unen para formar un complejo llamado SNARE (syntaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina) que

interactúa con dos proteínas solubles en el proceso de la ubicación: NSF (factor sensible a n-etilmaleimida) y a -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).

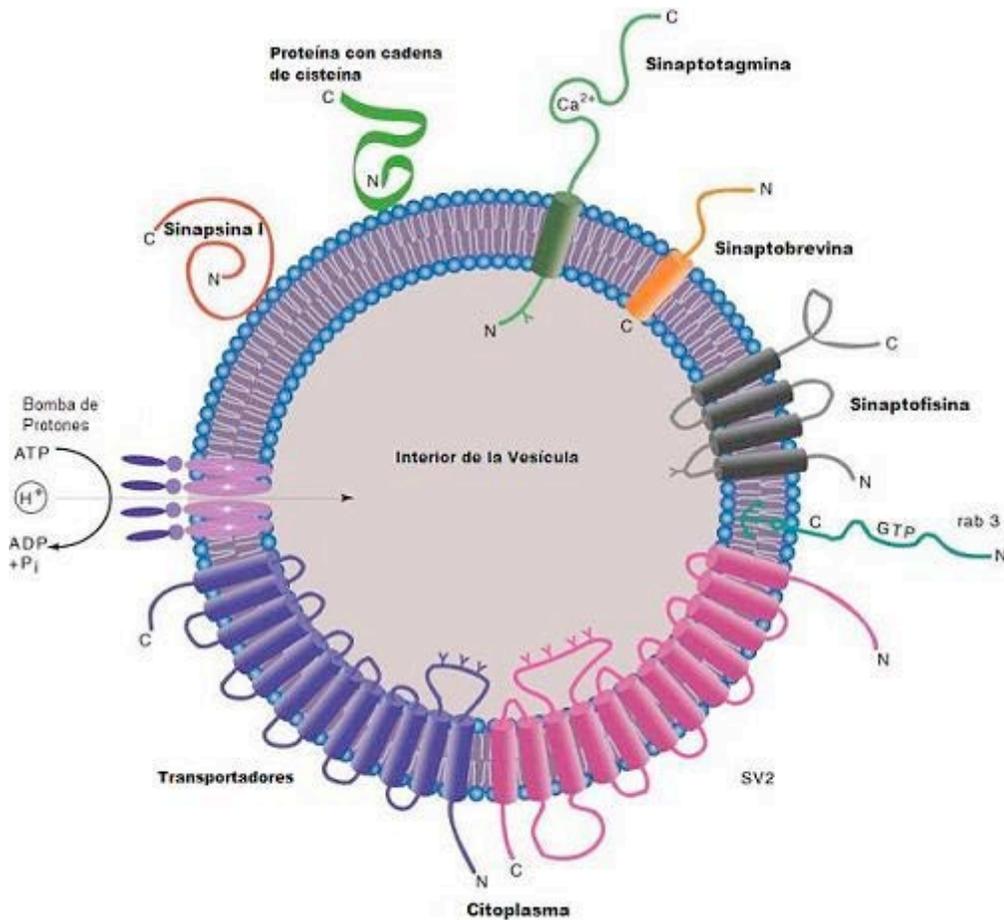


Fig 9. Representación esquemática de la estructura y topología de las principales proteínas de membrana de la vesícula sináptica. Modificado de Schwartz T. (2003).

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 (Fig 10). 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 (Valtorta, et al., 2004).

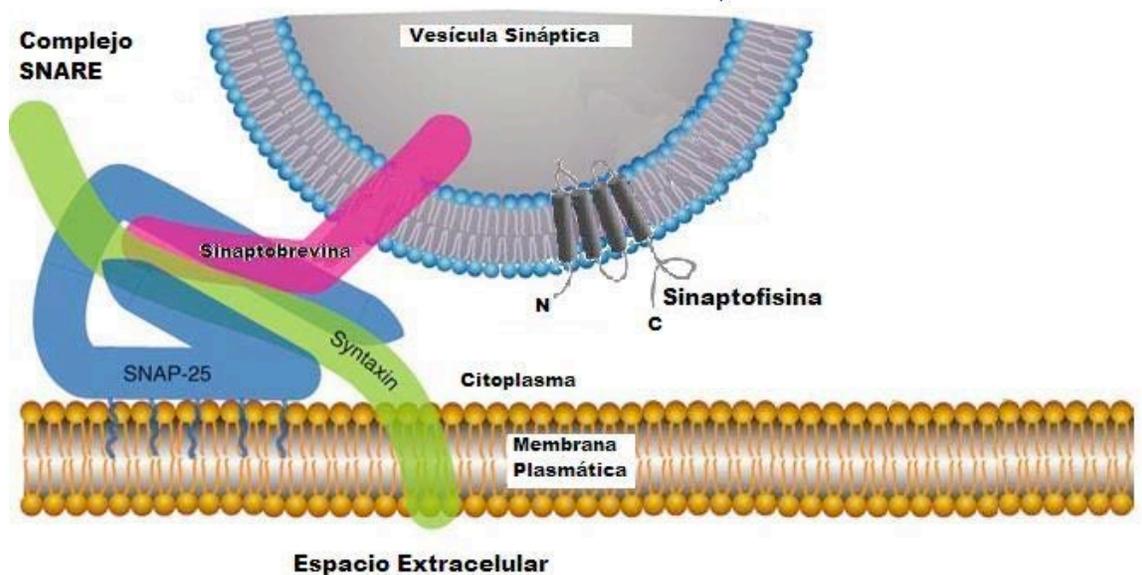


Fig 10. Fusión de la vesícula sináptica. El complejo SNARE (lado izquierdo de la figura) aproxima la vesícula con la membrana plasmática, esto representa uno de los pasos finales de la fusión de la vesícula. La sinaptobrevina, se une con la sintaxina y SNAP-25 que están ancladas a la membrana plasmática. Modificado de Schwarz, T.L. (2003).

## 8.2 Sinaptofisina.

Una de las proteínas más abundantes de membrana en las vesículas sinápticas es la sinaptofisina (Syp, por sus siglas en inglés, *synaptophysin*), la cual llega a ser hasta el 8% del total de proteínas de la vesícula (Knaus, et al., 1990). Es una glicoproteína de 38 kDa y contiene cuatro regiones transmembranales (fig 9) y un carboxilo terminal 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 (Wiedenmann y Franke, 1985; Evans y 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. La identificación de Syp como un componente molecular selectivo y permanentemente asociado a la membrana de vesículas sinápticas abre la posibilidad de usar anticuerpos a esta proteína para trazar los movimientos de las mismas en la neurona. De esta manera se está generando el camino para conocer los mecanismos de tráfico de membrana ya que esta proteína sola o en asociación con proteínas homólogas está involucrada en múltiples e importantes aspectos de la exocitosis de vesículas sinápticas, incluyendo el ensamble del complejo SNARE, la formación del poro de fusión, la activación de endocitosis y la biogénesis de la vesícula sináptica (Valtorta, et al., 2004). Por estas razones, Syp es el marcador inmunohistoquímico más usado para la determinación de posibles sitios sinápticos (Morrison y Prayson, 2000; Wick, 2000). Por otra parte, en estudios de sinaptogénesis se han encontrado altos niveles de expresión de Syp durante este proceso además de ser una de las proteínas sinápticas que más tempranamente se acumula durante la formación de sinapsis *in vitro* (Fletcher, et al., 1991).

Se han realizado un gran número de investigaciones acerca de la liberación de neurotransmisores y la posible función primordial de la sinaptofisina. Alder, et al., al microinyectar anticuerpos o fragmentos F(ab) contra Syp en blastómeros de embriones de un día de *Xenopus* antes de colocarlas en cultivo o en motoneuronas espinales y por medio de registros electrofisiológicos (utilizando la técnica patch-clamp) observaron que la inyección de anticuerpos de Syp redujo significativamente la frecuencia de los potenciales sinápticos espontáneos, sin afectar su amplitud. Estos resultados

sugieren que Syp es requerida para la liberación del neurotransmisor (Alder, et al., 1992). En 1995, Alder, et al., inducen la sobreexpresión de Syp en embriones de *Xenopus*, dando como resultado un fuerte incremento en la frecuencia, pero no en la amplitud de las corrientes sinápticas espontáneas. Sugiriendo que Syp no está implicada en determinar la cantidad de neurotransmisor liberado sino en la probabilidad de exocitosis vesicular y/o el número de vesículas sinápticas ancladas inicialmente en la zona activa (Alder, et al., 1995).

## **IX. MATERIAL Y METODO**

### **PROTOCOLO BIOQUIMICO**

#### **9.1- Animales y cirugía**

Setenta ratas macho cepa Wistar se mantuvieron bajo las mismas condiciones empleadas en el protocolo conductual y se realizó el procedimiento quirúrgico descrito anteriormente.

#### **9.2- Procedimiento conductual, microinyección y fármacos**

El procedimiento conductual y la microinyección se realizaron de la misma manera descrita en los apartados 5.1.3 y 5.1.4., siendo la única diferencia, el momento de sacrificio de los animales, esto es, los animales se dividieron en diferentes grupos: a) entrenados 1 día, b) entrenados 4 días y c) entrenados 4 días y probados a largo plazo 7 días después del entrenamiento.

Los fármacos utilizados para este protocolo fueron: Pirenzepina 42.43 mg/ml (Sigma, St. Louis, MO; Pir; n =37) y Vehículo (Solución Ringer: 118 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>; 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O) (n = 33).

#### **9.3- Extracción de la muestra y homogenización**

Los animales se decapitaron inmediatamente después del último entrenamiento según el grupo al que pertenecían 1 ó 4 días de entrenamiento u 11 días, es decir, este último grupo, después de la prueba de memoria a largo plazo. Tras la decapitación se disectaron las áreas CA3 y GD de una rebanada hipocampal de 2 a 3 mm de grosor, ubicada en las coordenadas en las que se realizaron las inyecciones, tomando como referencia para la disección el atlas de Paxinos (Paxinos y Watson, 1986). El tejido se colocó en buffer de lisis (50nM

Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 tableta de inhibidor de proteasas, ROCHE), se homogenizó y congeló a -72 °C hasta que fue requerido para el western blot.

#### **9.4- Cuantificación de proteínas**

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

#### **9.5- Western Blot**

En cada muestra se diluyeron 30 µg de homogenado 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% y fueron montados en una cámara de Western Blot (BIO-RAD); el gel está formado por un gel separador pH 8.8 al 12% (Tris 37.29 mM pH 8.8, SDS 3.4 mM, acrilamida 70 mM, 5µl de TEMED y APS 21.79 mM) y un gel concentrador pH 6.8 al 4.5% Tris pH 6.8 0.12 M, SDS 51 mM, acrilamida 32 mM, 5µl de TEMED y APS 6.4 mM). El gel cuenta con 10 carriles en donde se colocó un marcador de peso molecular, 6 muestras y un homogenado total. Una vez cargados los geles en la cámara se conectó 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 se transfirieron a una membrana de 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 cell); 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 el anticuerpo primario (Sinaptofisina, SIGMA, 1.3: 20000) por 90 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. Al terminar se realizaron cinco lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T. Posterior a los lavados, se colocó el anticuerpo secundario (anti-mouse, Zygmond 1: 3000) durante 90 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. Al término de este tiempo se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T y después las membranas fueron colocadas en la solución de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate de PIERCE). Finalmente se reveló con placa reveladora Kodak BioMax MR Film, Scientific imaging film.

## **9.6- Análisis de placas fotográficas y de membranas**

Las placas fotográficas se digitalizaron y las densidades de píxeles se determinaron por medio del programa Image J.

Las membranas fueron teñidas en Coomasie para observar la correcta posición de las columnas de corrimiento y el cargado de las proteínas.

## **9.7- Análisis Estadístico**

### **9.7.1. Protocolo Conductual**

Los datos de las curvas de aprendizaje fueron analizados por medio de una ANOVA de medidas repetidas y una prueba *post hoc* de Fisher. Los datos de las pruebas de MLP fueron analizados por medio de una ANOVA factorial de una vía o una t de student no pareada, dependiendo del número de grupos.

### **9.7.2. Protocolo Bioquímico**

En los geles se agregó un séptimo carril de homogenado total de corteza (HT), siendo tomadas todas las alícuotas de la misma muestra original, y usando la misma cantidad de proteínas que los demás carriles. Este homogenado se tomó como el 100% y se hizo la comparación con los demás carriles usando los valores obtenidos mediante el análisis de densidad óptica. Una vez obtenidos los porcentajes de homogenado total, se capturaron los datos de todos los geles y se llevó a cabo la estadística. Estos datos de densidad fueron analizados por medio de una ANOVA de medidas repetidas.

## **X. RESULTADOS.**

### **10.1 Determinación de la detección de sinaptofisina en CA3 como técnica para detectar la sinaptogénesis en esta área producida como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto de agua.**

Para determinar si la detección de sinaptofisina podía reflejar la sinaptogénesis encontrada en CA3 tras el sobreentrenamiento espacial (Ramirez-Amaya, et al., 1999; 2001), utilizamos este protocolo con un grupo de animales intactos que fueron sometidos al sobreentrenamiento en el laberinto de agua durante uno o cuatro días y los grupos control de nado de uno y cuatro días. Los animales del grupo control de nado son introducidos al laberinto acuático de Morris y son expuestos a nado el mismo número de veces así como el tiempo promedio de nado de los animales entrenados, la diferencia con este grupo es que se eliminan las claves espaciales mediante la colocación de cortinas negras alrededor del laberinto y no hay plataforma a la cual llegar, por lo que los animales no aprenden la localización de la plataforma.

Terminado el último ensayo de entrenamiento o de nado, los animales fueron sacrificados y se extrajeron las áreas de CA3 y como control de especificidad de cambio de la cantidad de sinaptofisina, el giro dentado (GD). Como se observa en la figura 11, a pesar de que el número de muestra fue solamente de 3, en el grupo de animales entrenados durante cuatro días la cantidad de sinaptofisina en CA3 presenta una tendencia no significativa a incrementarse con respecto al grupo de animales de control de nado (Fig. 11B). Además de que el efecto sólo fue observado en los animales entrenados, y no en los controles de nado. En el GD de estos animales no se observó esta tendencia (Fig. 11C).

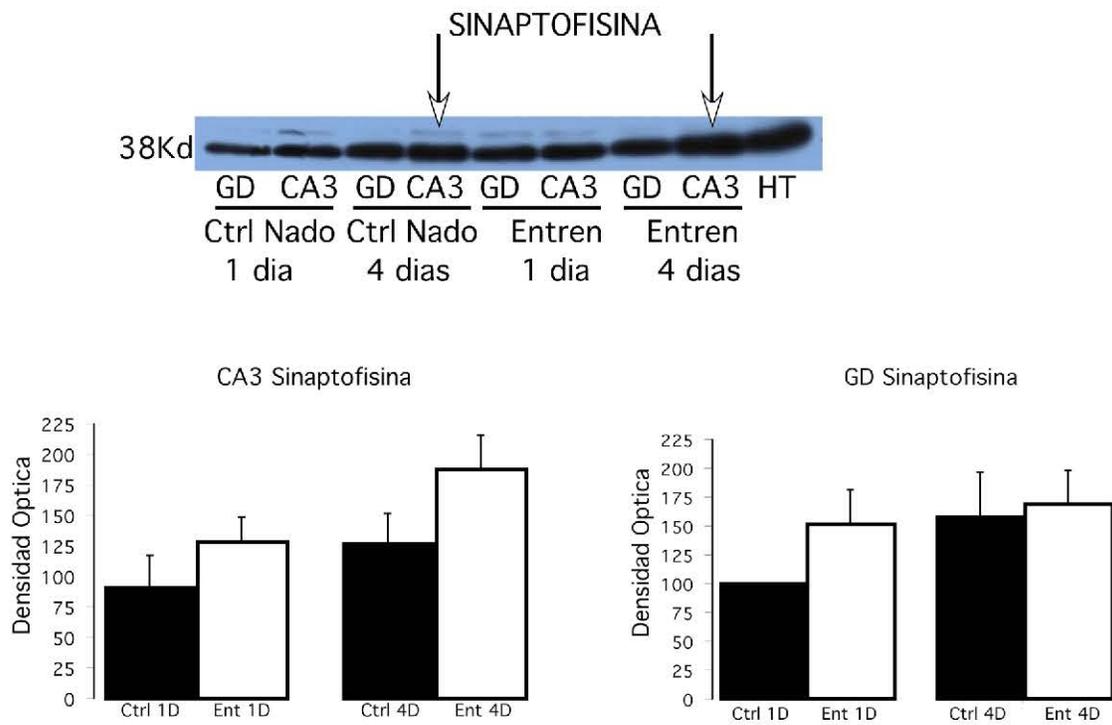


Figura 11.- Efecto del sobreentrenamiento espacial sobre la cantidad de sinaptofisina en CA3 y GD. A) Blot representativo. B) Sinaptofisina en CA3 expresada en unidades arbitrarias de densidad óptica. C) Sinaptofisina en GD expresada en unidades arbitrarias de densidad óptica. Ctrl 1D=control de nado de un día; Ent 1D=entrenado un día; Ctrl 4D=control de nado de cuatro días; Ent 4D=entrenado cuatro días.

## **10.2 Efecto de la inyección de pirenzepina en CA3 sobre la expresión de sinaptofisina en dicha área como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto de agua.**

Como se observa en la figura 12 A, la ANOVA de medidas repetidas no arrojó diferencias significativas en los grupos tratados con ringer y pirenzepina durante la adquisición de la tarea, sin embargo, en el grupo tratado con pirenzepina se encontró un déficit importante en la prueba de MLP, comparado con su ringer, tanto en la latencia de llegada al área de la plataforma ( $P < 0.01$ ) (Fig.12B), como en el número de cruces por esta área ( $P < 0.01$ ) (Fig.12C). Estos datos replican los resultados observados previamente en la primera sección de resultados de esta tesis (Fig. 6).

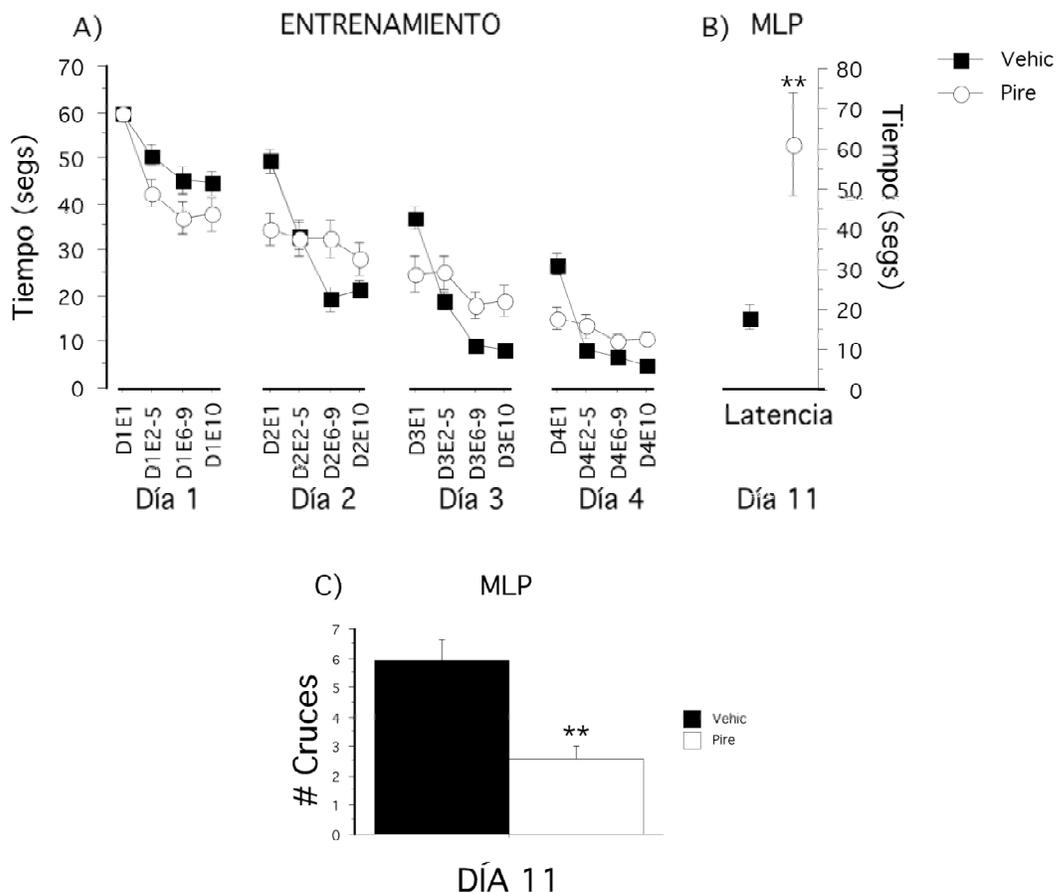


Figura 12.- Efecto de la inyección en CA3 de pirenzepina o vehículo antes del entrenamiento. (A) Curva de aprendizaje de los 4 días de entrenamiento, los puntos observados en la gráfica representan el primer y décimo ensayo así como el promedio de los ensayos 2 a 5 y 6 a 9 en cada uno de los días. B) Prueba de memoria a largo plazo medida por la latencia de llegada a donde estaba la plataforma y (C) el número de cruces por dicha área. \*\*= $p < 0.01$ .

Como se puede observar en la figura 13, en el análisis de los geles ( $n=5$ ) realizados mediante western blot, mediante una ANOVA factorial se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{5,48} = 2.384$ ,  $P = .05$ ), la prueba *post-hoc* de Fisher arrojó una diferencia significativa entre el grupo pirenzepina 11 días contra los grupos vehículo 11 días y pirenzepina 1 día ( $P < 0.05$ ), así como entre el grupo pirenzepina 11 días y los grupos vehículo 1 día, vehículo 4 días y pirenzepina 4 días ( $P < 0.01$ ), lo cual nos muestra una disminución significativa de la expresión de sinaptofisina en el grupo tratado con pirenzepina y que

realizó la prueba de MLP de manera deficiente (Fig.13B), con respecto al vehículo. (Dado que el grupo pirenzepina 11 días, es el único que presenta diferencias con todos los grupos, en la figura se muestra sólo la mayor significancia obtenida por este grupo).

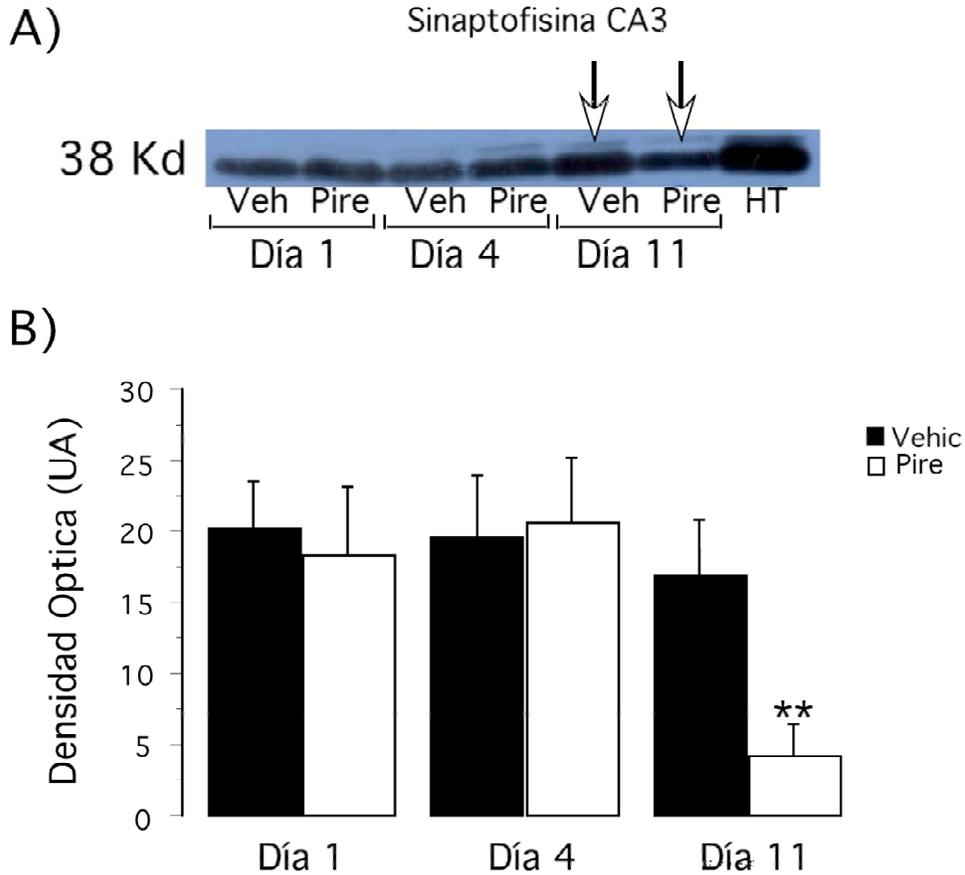


Figura 13.- Efecto de la inyección de pirenzepina en el área CA3 sobre la cantidad de sinaptofisina en esta área tras el sobreentrenamiento de una tarea espacial. A)Blot representativo B) Sinaptofisina en CA3 expresada en unidades arbitrarias de densidad óptica. \*\*= $p < 0.01$

## **XI. PLANTEAMIENTO DE LA 3ª HIPOTESIS**

Una de las principales cascadas de señalización intracelular activada por los receptores muscarínicos tipo M1 es la de la fosfolipasa C (PLC) que lleva a la activación de PKC (Felder, 1995). En algunos estudios, se ha encontrado que esta vía (M1-PKC) es muy importante para procesos de plasticidad sináptica (van de Zee y Douma, 1997; van der Zee y Luiten, 1999), y de acuerdo a nuestros resultados hemos encontrado que el uso de antagonistas al receptor M1 provoca un déficit en la consolidación de una tarea espacial pero no durante la adquisición de la misma. Además encontramos que este déficit conductual se ve reflejado en la expresión de sinaptofisina del área CA3 por lo que la 3ª pregunta en esta tesis fue la de saber cuáles son las vías de traducción intracelular del receptor M1 que pudiesen estar implicadas en la consolidación de esta memoria espacial. Por lo que de acuerdo a la bibliografía (van der Zee y Douma, 1997; van der Zee y Luiten, 1999; Rossi, et. al., 2005). PKC constituía un buen candidato para traducir la señal del receptor M1 en el área de CA3 y participar en la formación de la MLP del laberinto de agua. De esta manera, se realizaron los experimentos con el mismo paradigma conductual y bioquímico descrito anteriormente pero en esta ocasión se utilizó un inhibidor de PKC inyectado en el área CA3 y bajo las mismas condiciones que los experimentos anteriores. Se estudió cuál era su efecto a nivel conductual en cuanto a la adquisición y la consolidación de la tarea espacial así como la expresión de sinaptofisina en esta área hipocampal.

## XII. ANTECEDENTES DE LA 3ª HIPOTESIS

### 12.1 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 por calcio, diacilglicerol y ésteres de forbol para su activación (van der Zee y Douma, 1997). 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.

Hasta ahora, se han identificado 11 isoformas de PKC y poseen diferencias en cuanto a su localización, especificidad de sustrato y propiedades cinéticas (Newton, 1995). Estas isoformas están formadas por una sola cadena polipeptídica, dividida en dos dominios separados por la región hipervariable (también llamada 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 (Fig 14).

Las isoformas de PKC han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo a su estructura y a su regulación por cofactores: las convencionales (cPKC):  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ , las cuales son reguladas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) y  $\text{Ca}^{+2}$ , las nuevas (nPKC):  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\mu$  y  $\theta$ , reguladas por DAG y PS y las atípicas (aPKC):  $\lambda$  y  $\zeta$  cuya regulación no ha sido claramente establecida, aunque su actividad es estimulada por PS (Rendon y Robles, 2000) (Fig. 14).

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  $\text{Ca}^{+2}$ , 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-Rosen y Gordon, 1998).

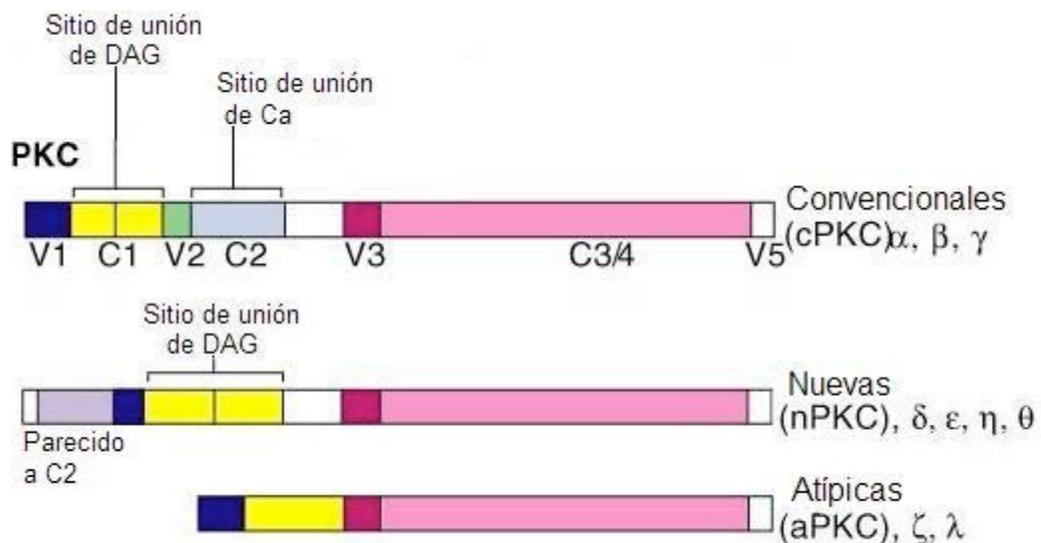


Fig 14. Dominios de la proteína cinasa C (PKC). Estructura primaria de las diferentes subfamilias de PKC. Cada una de ellas tiene dominios catalíticos homólogos. Los dominios regulatorios tienen sitios de unión para segundos mensajeros como calcio y diacilglicerol (DAG). Modificado de Schulman H., y Roberts J. (2003).

Como ya se ha mencionado, numerosos estudios han demostrado una correlación entre la LTP hipocámpal y los procesos de aprendizaje y memoria (Barnes y McNaughton, 1985; McNaughton, 1986) así como una similitud entre muchos de los elementos que intervienen para que se produzca la LTP y aquellos empleados en el aprendizaje. Ejemplo de ello es el trabajo de

Collingridge (1987), donde publicó que los canales glutamatérgicos tipo NMDA en el hipocampo, juegan un papel importante en la inducción de LTP pero no en su mantenimiento. Mientras que un flujo de calcio en la inducción de LTP lleva a un persistente incremento en la excitabilidad sináptica, esta excitación inducida por calcio es consecuencia de una cascada de eventos bioquímicos. Entre estos eventos, encontramos la activación de la proteína cinasa C (PKC). Se ha observado 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 expresión (Klann, et al., 1993).

Para inducir una LTP duradera se requieren estímulos umbrales y de alta frecuencia que provoquen la activación simultánea de un gran número de aferencias glutamatérgicas (Almaguer-Melian, et al., 2000). Sin embargo, no todos los mecanismos necesarios para la inducción del LTP son activadas eficazmente por la vía de los receptores NMDA, por lo que se sugiere un posible papel cooperativo de otras sinapsis en el desarrollo y mantenimiento del LTP. Ejemplo de ello es la privación del hipocampo de aferencias colinérgicas la cual bloquea el LTP en el giro dentado (Bergado, et al., 1996) y el trasplante de tejido fetal colinérgico a esos animales restaura el LTP (Bergado, et al., 1997). Así mismo, la administración de agonistas muscarínicos es capaz de inducir una potenciación que se desarrolle lentamente, y mimetiza las fases tardías del LTP (Auerbach y Segal, 1994; Auerbach y Segal, 1997). Los receptores muscarínicos, relacionados a proteínas G, promueven la activación de proteínas cinasas que actúan de manera conjunta con los mecanismos dependientes de NMDA en los procesos de plasticidad sináptica (Jerusalinsky, et al., 1997).

Alkon, et al (1988), estudiaron el aprendizaje asociativo en *Hermisenda*, encontraron que después de aprendida la tarea había una disminución del flujo de K<sup>+</sup> en la membrana somática de los fotorreceptores tipo B, este mismo efecto podía lograrse al activar a la PKC. Por otra parte, esta activación de PKC también producía 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 un menor tiempo en comparación con los controles, siendo la formación de esta memoria insensible a la inhibición de síntesis proteica con anisomisina, por lo que las proteínas necesarias para la formación de esta memoria a largo plazo ya habían sido sintetizadas como consecuencia de la activación de PKC (Alkon et al., 2005).

Por otro lado DeRiemer, 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.

De manera particular, PKC también está implicado en el aprendizaje espacial, se ha observado que posterior a una tarea espacial en este caso, un laberinto radial, la inmunoreactividad a PKC en el citosol disminuye mientras que a nivel membranal aumenta, por lo que de acuerdo con esto existe una migración de PKC del citosol a la membrana donde inicia su activación. Posteriormente observaron que al aplicar un activador de PKC, la retención de una tarea espacial mejoraba; caso contrario al inactivar PKC, pues la retención se veía deteriorada en comparación al grupo control (Nogues, et al., 1996).

Por otra parte, se ha encontrado que en ratas de mayor edad, la inmunoreactividad de PKC es mayor en la parte citosólica que en la de membrana sugiriendo que la actividad de PKC disminuye en la 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 y Gallagher, 2002), dicho déficit está asociado con el acoplamiento de proteínas G al receptor M1 así como la distribución de PKC $\gamma$ , es decir, las ratas jóvenes presentan una mayor afinidad en relación al acoplamiento de proteínas G a su receptor, y la proporción de distribución somato-dendrítica de PKC $\gamma$  es menor que en las ratas adultas por lo que el deterioro de la memoria espacial estaría relacionado con la disfuncionalidad de la traducción de señales iniciada por la sinapsis colinérgica (Rossi, et al., 2005).

## **XIII. MATERIAL Y METODO**

### **13.1- Animales y cirugía**

Cincuenta ratas macho cepa Wistar se mantuvieron bajo las mismas condiciones empleadas en el protocolo conductual y se realizó el procedimiento quirúrgico anteriormente descrito.

### **13.2- Procedimiento conductual, microinyección y fármacos**

El procedimiento conductual y la microinyección se realizaron de la misma manera descrita en los apartados 5.1.3; 5.1.4. y 9.2 Los fármacos utilizados para este protocolo fueron: 10 mM Queleritina (Hidrocloruro de queleritina, Sigma, St. Louis, MO; Quele; n =24); Vehículo (Agua bidestilada; n = 26).

### **13.3- Protocolo bioquímico (9.3)**

El protocolo bioquímico se realizó de la misma manera que se describe en los apartados 9.3; 9.4; 9.5; 9.6;

### **13.4- Análisis Estadístico**

#### **13.4.1. Protocolo Conductual**

Los datos de las curvas de aprendizaje fueron analizados por medio de una ANOVA de medidas repetidas y una prueba *post hoc* de Fisher. Los datos de las pruebas de MLP fueron analizados por medio de una t de student no pareada.

#### **13.4.2. Protocolo Bioquímico**

Los datos de densidad óptica fueron analizados por medio de una ANOVA de medidas repetidas.

## XIV. RESULTADOS

### 14.1 Efecto de la inhibición de la proteína cinasa C (PKC) en CA3 sobre el aprendizaje del laberinto acuático.

Los resultados sugieren fuertemente que la hipótesis planteada es correcta, ya que se observa un efecto muy similar al obtenido mediante la inyección de pirenzepina antes del entrenamiento. Es decir, los animales presentan una ejecución normal durante la adquisición de la tarea en los 4 días de entrenamiento (Fig.,15A), pero durante la prueba de MLP se encontró una diferencia significativa mediante una *t* de student no pareada tanto en el tiempo de latencia de llegada a la zona donde se encontraba la plataforma ( $p < 0.05$ ) (Fig.15B) como en el número de cruces por esta área ( $p < 0.05$ ) (Fig.15C).

### 14.2 Efecto de la inyección de queleritina en CA3 sobre la expresión de sinaptofisina en dicha área como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto acuático.

Una parte de los animales del experimento conductal mencionado en el apartado anterior (14.1) fue sometido a análisis bioquímico para determinar el efecto de la inhibición de PKC en CA3 sobre la sinaptogénesis observada en esta área como consecuencia del sobreentrenamiento espacial. Como se observa en la figura 16, en el análisis de los geles ( $n=3$ ) realizados mediante western blot, un ANOVA factorial mostró diferencias significativas entre los grupos ( $F_{5,12} = 3.483$ ,  $P < .05$ ) y la prueba *post-hoc* de Fisher mostró diferencias significativas entre los grupos vehículo 1 día y queleritina 11 días ( $p < .01$ ) y entre los grupos vehículo 11 días y queleritina 11 días ( $p < .05$ ). Lo cual nos muestra que el tratamiento empleado produce 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 MLP, siendo este efecto muy similar al producido por la pirenzepina.

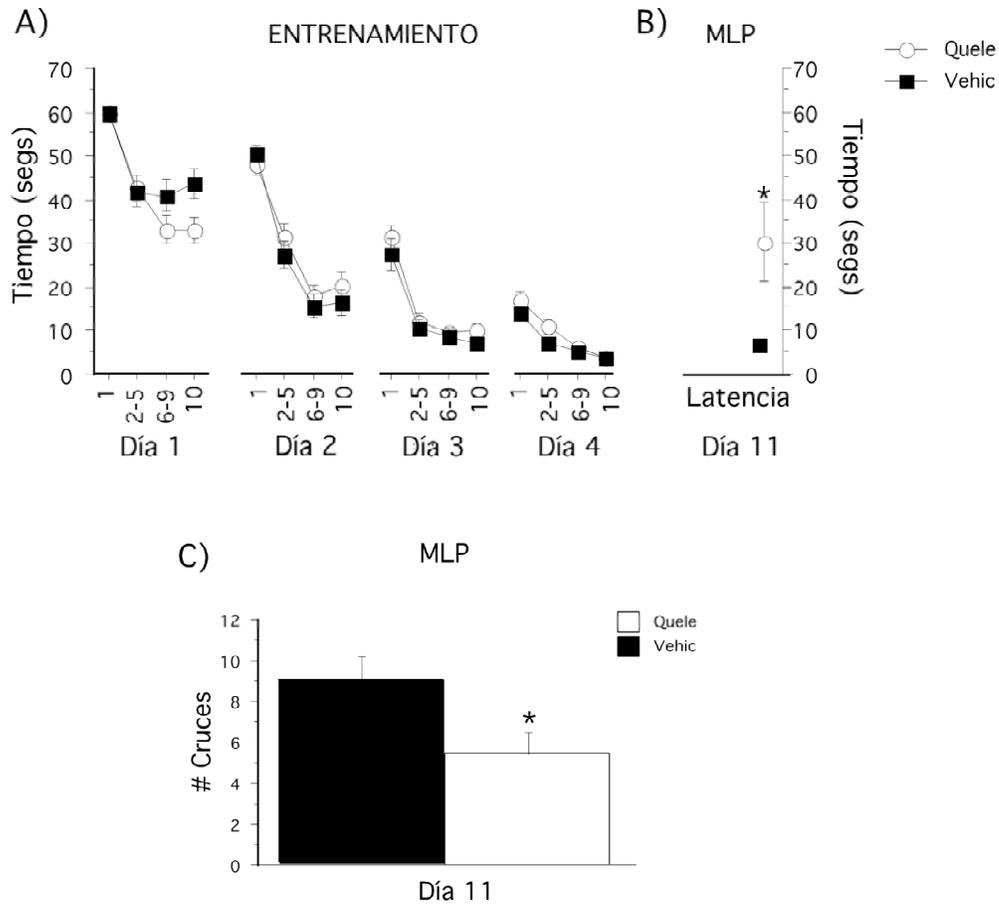


Figura 15.- Efecto de la inyección en el área CA3 de queleritina o vehículo antes del entrenamiento. (A) Curva de aprendizaje de los 4 días de entrenamiento, los puntos observados en la gráfica representan el primer y décimo ensayo así como el promedio de los ensayos 2 a 5 y 6 a 9 en cada uno de los días. (B) Prueba de memoria a largo plazo medida por la latencia de llegada a donde estaba la plataforma y (C) el número de cruces por dicha área. \*=  $p < 0.05$

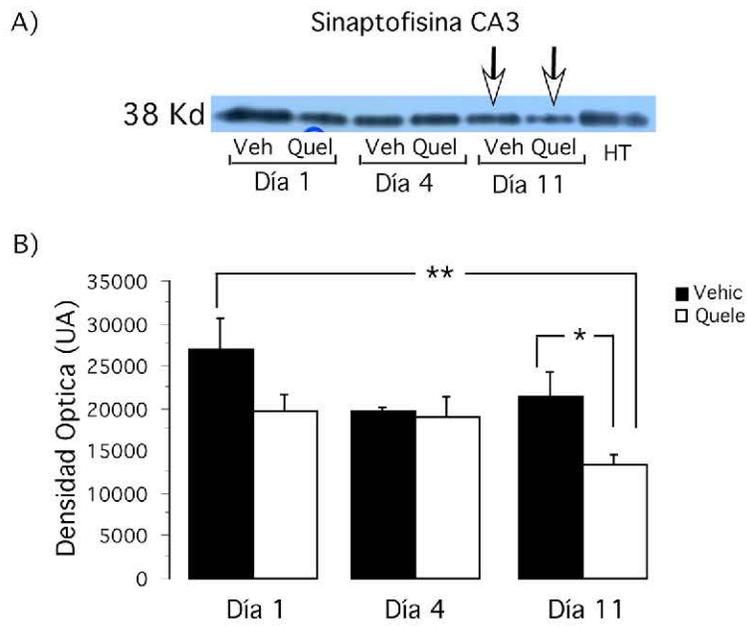


Figura 16.- Efecto de la inyección de queleritrina en el área CA3 de hipocampo sobre la cantidad de sinaptofisina en dicha área tras el sobreentrenamiento de una tarea espacial. A) Blot representativo B) Sinaptofisina en CA3 expresada en unidades arbitrarias de densidad óptica.  $*=p<0.05$ ,  $**=p<0.01$

## **XV. DISCUSIÓN.**

A lo largo de los experimentos de esta tesis hemos determinado que los receptores muscarínicos, en particular los postsinápticos M1, son de gran importancia para la formación de la memoria espacial a largo plazo en el laberinto acuático de Morris aunque sorprendentemente, el periodo en el que su importancia es fundamental, es durante el entrenamiento y no en el periodo de tiempo que le sigue. Además, obtuvimos evidencia que nos permite sugerir que la vía a través de la cual los receptores M1 participan en la formación de la memoria a largo plazo del laberinto de agua es a través de PKC, ya que su bloqueo produce un déficit en dicho proceso muy similar al observado mediante el bloqueo de los receptores M1.

Por otra parte, empleando el bloqueo de los receptores muscarínicos M1 como método para separar farmacológicamente la adquisición de la consolidación, obtuvimos resultados que sugieren que el incremento en las sinapsis en el área CA3 del hipocampo como consecuencia de un sobreentrenamiento en el laberinto acuático observado previamente (Ramírez-Amaya et al, 1999), es producto del proceso de consolidación de esta memoria, y dado que empleamos la detección de sinaptofisina en lugar de la técnica de Timm para observar el cambio en la cantidad de sinapsis, podemos argumentar que estas sinapsis son funcionales.

Se ha visto que el área CA3 del hipocampo está muy involucrada en procesos de aprendizaje . Se ha propuesto que dicha participación se debe en parte a la actividad reverberante de sus células piramidales (Stupien, et al. 2003; Florian y Rouillet 2004). Como ya se mencionó, se ha propuesto que las células piramidales de CA3 tiene la capacidad de mantener una memoria “activa” mediante la actividad reverberante de sus conexiones internas. Con base en un modelo computacional, se encontró que la estimulación de CA3 producía una reverberación de la actividad eléctrica en esta área que permitía el

mantenimiento de la señal producida por un estímulo “x”. Los autores proponen que esta actividad reverberante permitiría al estímulo “x” seguir presente cuando llegase un estímulo “y” para producir una asociación entre ambos (Wiebe et al, 1997).

También en el área de CA3 se ha encontrado un cambio estructural muy importante como consecuencia del sobreentrenamiento en el laberinto acuático, la sinaptogénesis en el *stratum oriens* (Ramirez-Amaya, et al. 1999;2001).

Sin embargo, hasta ahora los mecanismos neuroquímicos por medio de los cuáles el área CA3 participa en el aprendizaje espacial no han sido descritos. Debido a que se ha encontrado que los mAChR juegan un papel muy importante en el aprendizaje de diferentes tareas (Van der Zee, 1995; Van der Zee 1999), y dado que estos receptores son importantes dentro de CA3 para el mantenimiento de la actividad intrínseca de esta área , la primera aproximación que se utilizó en este trabajo fue determinar el papel de los receptores muscarínicos en CA3 durante el aprendizaje del laberinto acuático.

Los resultados demuestran que el bloqueo no selectivo de estos receptores, con escopolamina, antes del entrenamiento impide tanto la adquisición como la consolidación de la memoria espacial, sin embargo, cuando los mAChR son bloqueados después del entrenamiento con este fármaco, los animales pueden ejecutar perfectamente bien la tarea durante los días de entrenamiento y en la prueba a largo plazo realizada 7 días después del último día de entrenamiento.

Existen estudios que demuestran que los mAChR pre y postsinápticos juegan un papel diferencial en procesos de aprendizaje, siendo de fundamental importancia los receptores postsinápticos. En esta tesis encontramos que, en efecto, son los mAChR postsinápticos, particularmente los M1, los que juegan un papel fundamental en el área CA3 para el aprendizaje espacial a largo plazo del laberinto acuático, dado que el bloqueo de los receptores postsinápticos M3 no

produjeron ningún efecto ni en el aprendizaje ni en la formación de la memoria a largo plazo. Esto último concuerda con varios trabajos previos donde encuentran una función de mayor importancia del receptor M1 sobre el receptor M3 en procesos de plasticidad sináptica (Power, et al. 2003; Shinoe, et al. 2005), incluso se ha observado que el uso de un agonista a este receptor en un modelo animal de Alzheimer puede mejorar su desempeño en una tarea espacial (Caccamo, et al. 2006).

Por otra parte, el bloqueo de los receptores presinápticos, si bien produjo una tendencia a mejorar el aprendizaje, esta no fue significativa. Este dato concuerda con resultados previos del laboratorio donde se observó que, si bien el bloqueo de los receptores presinápticos producía un incremento en la liberación de ACh, no produjo mejora alguna ni en el aprendizaje ni en la inducción de LTP, a pesar de que para ambos procesos resultaba indispensable la actividad de los receptores muscarínicos (Ramírez-Lugo et al, 2003).

Interesantemente, si bien el bloqueo de los receptores M1 produjo un déficit en la MLP, no produjo efecto alguno sobre la adquisición, tal como se observó al inyectar escopolamina, que antagoniza todos los subtipos de receptores muscarínicos. Sin embargo, al inyectar una mezcla de un antagonista de los receptores M1 y un antagonista de los mAChR presinápticos, se obtiene un efecto tanto en la adquisición como en la formación de la MLP, demostrando que el efecto observado tras la inyección de escopolamina en CA3 es resultado del bloqueo de ambos subtipos de receptores (presinápticos y postsinápticos), y no un efecto inespecífico del fármaco.

Otra posible explicación para este efecto sería que tras la inyección de la mezcla de fármacos para bloquear receptores M2 y M1, los receptores M3 quedan libres y podrían estar siendo sobreestimulados por el exceso de ACh producido por el bloqueo de los receptores M2, provocando un déficit en el aprendizaje. Sin embargo, el hecho de que la inyección de escopolamina produzca el mismo efecto, sugiere que el efecto de la inyección de la mezcla de fármacos sobre el

aprendizaje radica en que se encuentran bloqueados tanto los mAChR presinápticos como los postsinápticos, ya que la escopolamina puede bloquear los 5 tipos de mAChR, incluyendo los M3.

El efecto del bloqueo de los receptores M1 sobre el aprendizaje del laberinto de agua generó dos interrogantes muy interesantes. Por un lado, observamos que el uso de antagonistas al receptor M1 produce un déficit en la formación de la MLP del laberinto acuático, sin embargo, los animales son perfectamente capaces de recordar la tarea 24 horas después del entrenamiento, tiempo que para muchas tareas sería considerado como MLP (Izquierdo, et al. 1999; Ferreira, et al. 2002). Dado que la MLP se ve afectada en estos animales, los resultados sugieren que, al menos en CA3, el entrenamiento en este laberinto genera una MCP capaz de perdurar por al menos 24 horas, que puede ser retomada si el animal es sometido nuevamente a la tarea, pero después de siete días del último entrenamiento (tiempo tras el cuál se mide la MLP) esta MCP ya no se encuentra activa, por lo que para que el animal ejecute la tarea requiere que se haya guardado una MLP de la misma. Si bien es cierto que 24 horas pueden parecer mucho tiempo para una MCP, hay que recordar que las neuronas piramidales de CA3 tiene la capacidad de presentar una actividad reverberante, que en nuestro caso ayudaría a mantener “activa” esta MCP por un periodo de tiempo más largo de lo que habitualmente se observa .

Por otra parte, dado que el bloqueo de todos los mAChR con escopolamina después del entrenamiento no produce ningún efecto sobre la formación de la MLP, y el bloqueo de los receptores M1 en particular no afecta en absoluto la adquisición, mientras que impide la correcta formación de la MLP, significa que la activación de estos receptores tiene un efecto durante el periodo de entrenamiento que es indispensable únicamente para la consolidación, y no para la adquisición de la tarea. La participación temprana de los mAChR en la consolidación podría consistir en cambios generados por la actividad de los receptores M1, tales como activación de cinasas o la fosforilación de receptores

(Engisch, et al. 1996; Liao, et al. 2001), que cambiarían el ambiente bioquímico dentro de la neurona, de manera que más tarde el proceso de consolidación pueda llevarse a cabo de manera eficiente, dado que los elementos necesarios para que esto suceda ya estarían presentes en la célula. Esto dejaría lugar a que los receptores M1 no sean necesarios para llevar a cabo el proceso de consolidación una vez que hayan dejado su huella bioquímica dentro de la neurona, explicando porqué juegan un papel fundamental para la consolidación de la memoria del laberinto acuático, a pesar de que su bloqueo tras el entrenamiento ya no tiene ningún efecto sobre la formación de la MLP.

En este sentido, se ha demostrado que tras el entrenamiento en una tarea espacial se observa un incremento en la inmunoreactividad tanto para los mAChR como para PKC $\gamma$  en las principales neuronas hipocampales . Probablemente PKC $\gamma$  fosforila proteínas implicadas en un cambio intracelular persistente que supera la duración del estímulo inicial (Rossi, et al. 2005).

Ayudando esta teoría, encontramos que la inhibición de PKC en CA3 no tiene efecto alguno sobre la adquisición de la tarea, pero impide la correcta formación de la MLP. Este efecto es muy similar al producido por el bloqueo de los receptores M1, sugiriendo fuertemente que una de las vías activadas por los receptores M1 durante el periodo de entrenamiento es la vía de PKC, quien quizás participe en el proceso de consolidación en un tiempo posterior, cuando los receptores M1 ya no están activos. Se ha reportado en la literatura que algunos eventos plásticos, tales como el aprendizaje espacial o gustativo (Krivanek 1997; Van der Zee, et al. 1997) generan cambios en la actividad de PKC que pueden durar por horas, siendo una especie de huella bioquímica del evento plástico. En el caso presentado en esta tesis, podría ser que la activación de los receptores M1 generara una actividad sostenida de PKC necesaria para llevar a cabo el proceso de consolidación, de manera similar a la idea propuesta por van der Zee .

Dado que el bloqueo de los receptores M1 en CA3 antes del entrenamiento en el laberinto acuático produjo un déficit en la formación de la MLP sin afectar la

adquisición, esto nos proporcionó una herramienta farmacológica para separar el proceso de adquisición del de consolidación. Como ya se mencionó, el sobreentrenamiento en el laberinto de agua induce una importante sinaptogénesis en CA3, proceso que se sugiere está asociado a la consolidación y no a la adquisición de esta tarea, aunque hasta ahora no había sido posible asegurarlo, ya que los tratamientos utilizados no podían distinguir entre estos dos procesos (Ramirez-Amaya, et al. 1999; 2001).

Por lo anterior, decidimos bloquear los receptores M1 durante el entrenamiento en el laberinto de agua para determinar el efecto de este tratamiento sobre la sinaptogénesis encontrada en el área CA3 por Ramírez-Amaya et al. (1999; 2001). Adicionalmente, introdujimos una metodología diferente para el estudio de la sinaptogénesis en CA3, el análisis por medio de western blots de la expresión de sinaptofisina, proteína integral de la vesícula sináptica cuya presencia está fuertemente relacionada con la capacidad de una sinápsis para liberar neurotransmisor, por lo que es frecuentemente utilizada para determinar la funcionalidad de una sinápsis (Alder, et al. 1992; Morrison y Prayson 2000; Wick 2000). Si bien las pruebas piloto que hicimos no alcanzaron una diferencia estadísticamente significativa debido a la reducida muestra (n=3), si muestra una clara tendencia de la sinaptofisina a incrementarse en CA3, pero no en GD, tras el sobreentrenamiento espacial, por lo que decidimos proceder a los siguientes experimentos.

Encontramos que la cantidad de sinaptofisina detectada en CA3 tras el sobreentrenamiento en una tarea espacial es significativamente menor en los animales que recibieron un antagonista de los receptores M1 en CA3 durante el entrenamiento y que, como demuestran los datos conductuales, presentan una adquisición eficiente pero un déficit importante en la formación de la MLP. Sin embargo, encontramos que, a pesar de un claro efecto del fármaco sobre la presencia de sinaptofisina en CA3 tras el sobreentrenamiento espacial, la tendencia original de esta proteína de incrementarse en CA3 con el

sobrentrenamiento en comparación a los primeros días no fue observada. Este tipo de efecto de la implantación de cánulas y microinyección en el cerebro, sobre eventos bioquímicos asociados al aprendizaje, ya se ha encontrado con otras proteínas en otros modelos de aprendizaje, en nuestro laboratorio. Este efecto de la cirugía se observa generalmente como un incremento en la señal detectada en los animales controles, dificultando su distinción de los animales entrenados. Sin embargo, una constante en todos los casos es que cuando el fármaco tiene un efecto sobre la actividad bioquímica de la neurona, este efecto es contundente. Con base en lo anterior podemos sugerir que, efectivamente, la cantidad de sinaptofisina detectada en CA3 tras el sobrentrenamiento en el laberinto acuático, se debe a la consolidación, y no a la adquisición de esta tarea.

Adicionalmente, dado que encontramos que la inhibición de PKC tiene el mismo efecto conductual que el bloqueo de los receptores M1, es decir, afecta la consolidación pero no la adquisición de la tarea espacial en el laberinto acuático y además encontramos que PKC juega un papel importante en la vía de transducción utilizada por el receptor M1 en CA3 durante la formación de la MLP del laberinto de agua, el siguiente paso fue determinar si era a través de esta vía que el receptor M1 regulaba el incremento en la cantidad de sinaptofisina en CA3 como consecuencia del sobrentrenamiento en el laberinto de agua. Los resultados sugieren un papel importante de PKC en este proceso, apoyando la idea de la participación secuencial de los receptores M1 y PKC en la formación de la MLP.

En resumen, a lo largo de esta tesis hemos comenzado a dilucidar los mecanismos bioquímicos por medio de los cuales CA3 participa en la formación de la memoria de una tarea espacial, el laberinto acuático de Morris. Determinamos la participación de los diferentes tipos de mAChR, así como de la PKC en la adquisición y consolidación de esta tarea, y en la cantidad de sinaptofisina en el área de CA3 tras la prueba de MLP, empleada como

marcador de sinapsis posiblemente funcionales, como consecuencia del sobreentrenamiento espacial. Sin embargo, aún quedan muchas interrogantes por resolver, tales como el papel de otros sistemas de neurotransmisión (p. ej. el glutamatérgico) en esta área, así como el resto de los mecanismos intracelulares involucrados.

Otro punto interesante arrojado por los resultados de este trabajo es la existencia de una memoria a corto plazo cuya duración es de al menos 24 hrs, tiempo que excede el reportado para otras tareas. Se propone en esta tesis que es gracias a la actividad reverberante de la que son capaces las neuronas de CA3, que es posible la duración de la memoria a corto plazo.

Para el caso de la memoria espacial, en esta tesis se propone también que durante el aprendizaje espacial el animal trabaje en paralelo con una memoria a corto plazo con base en la cual realiza la tarea de manera cotidiana, y al mismo tiempo genere una memoria a largo plazo que producirá cambios más drásticos en la estructura sináptica. Sin embargo, las implicaciones de este fenómeno alcanzan otros tipos de memoria, pudiendo permitir que el organismo elabore memorias episódicas complejas con diferentes componentes y sus respectivas relaciones espacio-temporales, así como la “reactivación” de una memoria para integrar a ella información relevante, y muchas posibilidades más. Por lo tanto, esta es un área que requiere mayor exploración.

## **XVI. CONCLUSIONES.**

- Los receptores muscarínicos en el área CA3 están involucrados en la formación de la memoria del laberinto acuático de Morris.
- La participación de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos es diferencial, siendo los postsinápticos M1 de particular importancia para la formación de la memoria espacial a largo plazo.
- La activación de PKC en el área CA3 es necesaria para la formación de la memoria espacial a largo plazo de manera muy similar al papel del receptor M1 en este proceso.
- Estos resultados y la literatura sugieren que PKC juega un papel muy importante en la vía desencadenada por los receptores M1 para la formación de la memoria a largo plazo.
- La expresión de sinaptofisina en CA3 después de la prueba de memoria a largo plazo se ve afectada por el uso de antagonistas a los receptores M1, así como por la inhibición de PKC.
- La disminución en la expresión de sinaptofisina en CA3, tras el bloqueo de receptores M1 o la inhibición de PKC durante el entrenamiento, parece tener una relación directa con el déficit que estos mismos tratamientos provocan sobre la conducta.

## XVII. REFERENCIAS

- Alder, J., H. Kanki, et al. (1995). "Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses." J Neurosci **15**(1 Pt 2): 511-9.
- Alder, J., Z. P. Xie, et al. (1992). "Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses." Neuron **9**(4): 759-68.
- Alkon, D. L., H. Epstein, et al. (2005). "Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16432-7.
- Alkon, D. L., S. Naito, et al. (1988). "Regulation of *Hermissenda* K<sup>+</sup> channels by cytoplasmic and membrane-associated C-kinase." J Neurochem **51**(3): 903-17.
- Almaguer-Melian, W. y J. A. Bergado-Rosado (2002). "[Interactions between the hippocampus and the amygdala in synaptic plasticity processes. A key to understanding the relations between motivation and memory]." Rev Neurol **35**(6): 586-93.
- Almaguer-Melian, W., R. Cruz-Aguado, et al. (2000). "Synaptic plasticity is impaired in rats with a low glutathione content." Synapse **38**(4): 369-74.
- Amaral, D. G., N. Ishizuka, et al. (1990). "Neurons, numbers and the hippocampal network." Prog Brain Res **83**: 1-11.
- Amaral, D. G. y J. Kurz (1985). "An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat." J Comp Neurol **240**(1): 37-59.
- Amaral, D. G. y M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." Neuroscience **31**(3): 571-91.
- Amaral, D. G. a. W., MP. (1995). Hippocampal formation. The rat nervous system. G. Paxinos. New York, Academic Press: 443-493.
- Ambrogì Lorenzini, C., E. Baldi, et al. (1994). "Post-training nucleus basalis magnocellularis functional tetrodotoxin blockade effects on passive avoidance consolidation in the rat." Behav Brain Res **61**(2): 191-6.
- Anderson, J. (2001). Perspectivas del aprendizaje y la memoria. Aprendizaje y memoria. Un enfoque integral. México, Mc Graw Hill: 1-41.
- Atkinson, R. C. y R. M. Shiffrin (1968). Human Memory: A proposed system and its control processes. The psychology of learning and motivation. Spence. New York, Academic Press. **2**.
- Auerbach, J. M. y M. Segal (1994). "A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus." J Neurophysiol **72**(4): 2034-40.
- Auerbach, J. M. y M. Segal (1997). "Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus." J Neurosci **17**(22): 8695-701.
- Bailey, C. H. y E. R. Kandel (1993). "Structural changes accompanying memory storage." Annu Rev Physiol **55**: 397-426.

- Barnes, C. A. y B. L. McNaughton (1985). "An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses." Behav Neurosci **99**(6): 1040-8.
- Bear, M. F. (1996). "A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13453-9.
- Bennett, M. R. (2000). "The concept of long term potentiation of transmission at synapses." Prog Neurobiol **60**(2): 109-37.
- Bergado, J. A., H. Moreno, et al. (1996). "Fimbria-fornix lesion impairs long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat." Biol Res **29**(2): 197-202.
- Bergado, J. A., H. Moreno, et al. (1997). "Septal fetal tissue transplants restore long-term potentiation in the dentate gyrus of fimbria-formix-lesioned rats." J Neural Transplant Plast **6**(1): 31-40.
- Bermúdez-Rattoni F., Prado-Alcala. R. (2001). Memoria. Dónde reside y cómo se forma. México, D.F., Ed. Trillas.
- Bliss, T. V. y G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-9.
- Bliss, T.V.P y Lomo, T. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the denate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." Journal of Physiology (London) **232**: 331-356.
- Burges, N., K. J. Jeffery, et al. (1999). The hippocampal and parietal foundations of spatial cognition. England, Oxford University Press.
- Caccamo, A., S. Oddo, et al. (2006). "M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice." Neuron **49**(5): 671-82.
- Carli, M., R. Luschi, et al. (1997). "Dose-related impairment of spatial learning by intrahippocampal scopolamine: antagonism by ondansetron, a 5-HT3 receptor antagonist." Behav Brain Res **82**(2): 185-94.
- Carlsen, J., J. De Olmos, et al. (1982). "Tracing of two-neuron pathways in the olfactory system by the aid of transneuronal degeneration: projections to the amygdaloid body and hippocampal formation." J Comp Neurol **208**(2): 196-208.
- Cassel, J. C., E. Duconseille, et al. (1997). "The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques." Prog Neurobiol **51**(6): 663-716.
- Caulfield, M. P., G. A. Higgins, et al. (1983). "Central administration of the muscarinic receptor subtype-selective antagonist pirenzepine selectively impairs passive avoidance learning in the mouse." J Pharm Pharmacol **35**(2): 131-2.
- Colombo, P. J. y M. Gallagher (2002). "Individual differences in spatial memory among aged rats are related to hippocampal PKCgamma immunoreactivity." Hippocampus **12**(2): 285-9.
- Collingridge, G. (1987). "Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory." Nature **330**(6149): 604-5.
- De Paola, V., S. Arber, et al. (2003). "AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks." Nat Neurosci **6**(5): 491-500.

- Degroot, A. y M. B. Parent (2000). "Increasing acetylcholine levels in the hippocampus or entorhinal cortex reverses the impairing effects of septal GABA receptor activation on spontaneous alternation." Learn Mem **7**(5): 293-302.
- DeRiemer, S. A., J. A. Strong, et al. (1985). "Enhancement of calcium current in Aplysia neurones by phorbol ester and protein kinase C." Nature **313**(6000): 313-6.
- Dudai, Y. (1989). Some basis notions and their ontogenesis. The neurobiology of memory: concepts, findings, trends. New York, Oxford UP: 3-18.
- Durkin, T. P. (1992). "GABAergic mediation of indirect transsynaptic control over basal and spatial memory testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic activity in mice." Behav Brain Res **50**(1-2): 155-65.
- Dutar, P., M. H. Bassant, et al. (1995). "The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system." Physiol Rev **75**(2): 393-427.
- Eichenbaum, H. (2003). Learning and memory: Brain Systems. Fundamental Neuroscience. L. R. B. M. C. Squire. San Diego, Academic Press: 1299-1326.
- Eichenbaum, H. (1999). "The hippocampus and mechanisms of declarative memory." Behav Brain Res **103**(2): 123-33.
- Engisch, K. L., J. J. Wagner, et al. (1996). "Whole-cell voltage-clamp investigation of the role of PKC in muscarinic inhibition of IAHP in rat CA1 hippocampal neurons." Hippocampus **6**(2): 183-91.
- Escobar, M. L., E. J. Barea-Rodriguez, et al. (1997). "Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation." Brain Res **751**(2): 330-5.
- Evans, G. J. y M. A. Cousin (2005). "Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling." Biochem Soc Trans **33**(Pt 6): 1350-3.
- Fadda, F., S. Cocco, et al. (2000). "Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats." Neuroreport **11**(10): 2265-9.
- Farley, J. y S. Auerbach (1986). "Protein kinase C activation induces conductance changes in Hermissenda photoreceptors like those seen in associative learning." Nature **319**(6050): 220-3.
- Felder, C. C. (1995). "Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors." Faseb J **9**(8): 619-25.
- Ferreira, A. R., L. Furstenu, et al. (2003). "Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat." Pharmacol Biochem Behav **74**(2): 411-5.
- Ferreira, G., R. Gutierrez, et al. (2002). "Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory." Eur J Neurosci **16**(6): 1139-45.
- Fletcher, T. L., P. Cameron, et al. (1991). "The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture." J Neurosci **11**(6): 1617-26.

- Florian, C. y P. Roulet (2004). "Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice." Behav Brain Res **154**(2): 365-74.
- Gold, P. E. (2003). "Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory." Neurobiol Learn Mem **80**(3): 194-210.
- Greenough, W. T., J. R. Larson, et al. (1985). "Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat motor-sensory forelimb cortex." Behav Neural Biol **44**(2): 301-14.
- Greenough, W. T., R. W. West, et al. (1978). "Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat." Science **202**(4372): 1096-8.
- Hollup, S. A., K. G. Kjelstrup, et al. (2001). "Impaired recognition of the goal location during spatial navigation in rats with hippocampal lesions." J Neurosci **21**(12): 4505-13.
- Houpt, T. A. y R. Berlin (1999). "Rapid, labile, and protein synthesis-independent short-term memory in conditioned taste aversion." Learn Mem **6**(1): 37-46.
- Izquierdo, I., J. H. Medina, et al. (1999). "Separate mechanisms for short- and long-term memory." Behav Brain Res **103**(1): 1-11.
- Jerusalinsky, D., E. Kornisiuk, et al. (1997). "Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing." Neurochem Res **22**(4): 507-15.
- Kandel, E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses." Biosci Rep **21**(5): 565-611.
- Kandel, E. R. (2001). Citología de las neuronas. Principios de Neurociencia E.R Kandel, J. H. Schwartz y T.M. Jessell. Madrid. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. 67-87.
- Klann, E., S. J. Chen, et al. (1993). "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 U S A **90**(18): 8337-41.
- Knaus, P., B. Marqueze-Pouey, et al. (1990). "Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles." Neuron **5**(4): 453-62.
- Krivanek, J. (1997). "Protein kinase C in the parabrachial nucleus of rats during conditioned taste aversion induced by amphetamine." Neurosci Lett **236**(1): 17-20.
- Lamprecht, R. y J. LeDoux (2004). "Structural plasticity and memory." Nat Rev Neurosci **5**(1): 45-54.
- Lee, I., T. S. Jerman, et al. (2005). "Disruption of delayed memory for a sequence of spatial locations following CA1- or CA3-lesions of the dorsal hippocampus." Neurobiol Learn Mem **84**(2): 138-47.
- Lendvai, B., E. A. Stern, et al. (2000). "Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo." Nature **404**(6780): 876-81.
- Liao, G. Y., D. A. Wagner, et al. (2001). "Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current." Mol Pharmacol **59**(5): 960-4.

- Maguire, E. A., N. Burgess, et al. (1998). "Knowing where and getting there: a human navigation network." Science **280**(5365): 921-4.
- Mansuy, I. M., M. Mayford, et al. (1998). "Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory." Cell **92**(1): 39-49.
- Marino, M. J., S. T. Rouse, et al. (1998). "Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11465-70.
- Mayford, M., J. Wang, et al. (1995). "CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP." Cell **81**(6): 891-904.
- McGaugh, J. L., L. Cahill, et al. (1996). "Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13508-14.
- McKinney, R. A., A. Luthi, et al. (1999). "Selective glutamate receptor antagonists can induce or prevent axonal sprouting in rat hippocampal slice cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11631-6.
- McNaughton, B. L., C. A. Barnes, et al. (1986). "Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information." J Neurosci **6**(2): 563-71.
- Messer, W. S., Jr., M. Bohnett, et al. (1990). "Evidence for a preferential involvement of M1 muscarinic receptors in representational memory." Neurosci Lett **116**(1-2): 184-9.
- Mesulam, M. M., E. J. Mufson, et al. (1983). "Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey." J Comp Neurol **214**(2): 170-97.
- Mesulam, M. M., E. J. Mufson, et al. (1983). "Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6)." Neuroscience **10**(4): 1185-201.
- Milner, B., L. R. Squire, et al. (1998). "Cognitive neuroscience and the study of memory." Neuron **20**(3): 445-68.
- Minichiello, L., M. Korte, et al. (1999). "Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning." Neuron **24**(2): 401-14.
- Mizumori, S. J., C. A. Barnes, et al. (1989). "Reversible inactivation of the medial septum: selective effects on the spontaneous unit activity of different hippocampal cell types." Brain Res **500**(1-2): 99-106.
- Mizumori, S. J., B. L. McNaughton, et al. (1989). "Preserved spatial coding in hippocampal CA1 pyramidal cells during reversible suppression of CA3c output: evidence for pattern completion in hippocampus." J Neurosci **9**(11): 3915-28.
- Mochly-Rosen, D. y A. S. Gordon (1998). "Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity." Faseb J **12**(1): 35-42.

- Mongeau, R., P. Blier, et al. (1997). "The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments." Brain Res Rev **23**(3): 145-95.
- Morgado, I. (2005). "[The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances]." Rev Neurol **40**(5): 289-97.
- Morris, R. G. and U. Frey (1997). "Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352**(1360): 1489-503.
- Morris, R. G., P. Garrud, et al. (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." Nature **297**(5868): 681-3.
- Morris, R. G., F. Schenk, et al. (1990). "Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning." Eur J Neurosci **2**(12): 1016-1028.
- Morrison, C. D. y R. A. Prayson (2000). "Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system." Semin Diagn Pathol **17**(3): 204-15.
- Moser, M. B., M. Trommald, et al. (1994). "An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12673-5.
- Naumann, T., R. Linke, et al. (1992). "Fine structure of rat septohippocampal neurons: I. Identification of septohippocampal projection neurons by retrograde tracing combined with electron microscopic immunocytochemistry and intracellular staining." J Comp Neurol **325**(2): 207-18.
- Nerad, L., V. Ramirez-Amaya, et al. (1996). "Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning." Neurobiol Learn Mem **66**(1): 44-50.
- Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." J Biol Chem **270**(48): 28495-8.
- Nogues, X., R. Jaffard, et al. (1996). "Investigations on the role of hippocampal protein kinase C on memory processes: pharmacological approach." Behav Brain Res **75**(1-2): 139-46.
- Ohno, M., T. Yamamoto, et al. (1994). "Blockade of hippocampal M1 muscarinic receptors impairs working memory performance of rats." Brain Res **650**(2): 260-6.
- Paxinos, G. a. W., C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, Academic Press.
- Penfield, W. y B. Milner (1958). "Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone." AMA Arch Neurol Psychiatry **79**(5): 475-97.
- Pfenninger, K., K. Akert, et al. (1972). "The fine structure of freeze-fractured presynaptic membranes." J Neurocytol **1**(2): 129-49.
- Power, A. E., A. Vazdarjanova, et al. (2003). "Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation." Neurobiol Learn Mem **80**(3): 178-93.

- Ragozzino, M. E. y P. E. Gold (1995). "Glucose injections into the medial septum reverse the effects of intraseptal morphine infusions on hippocampal acetylcholine output and memory." Neuroscience **68**(4): 981-8.
- Ragozzino, M. E., S. N. Pal, et al. (1998). "Modulation of hippocampal acetylcholine release and spontaneous alternation scores by intrahippocampal glucose injections." J Neurosci **18**(4): 1595-601.
- Rahamimoff, R., S. A. DeRiemer, et al. (1988). "Ion channels in synaptic vesicles from Torpedo electric organ." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5310-4.
- Raiteri, M., R. Leardi, et al. (1984). "Heterogeneity of presynaptic muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in the rat brain." J Pharmacol Exp Ther **228**(1): 209-14.
- Ramirez-Amaya, V., I. Balderas, et al. (2001). "Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis." J Neurosci **21**(18): 7340-8.
- Ramirez-Amaya, V., M. L. Escobar, et al. (1999). "Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining." Hippocampus **9**(6): 631-6.
- Ramirez-Lugo L., Miranda M., et al., (2003). "The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation." Neurobiol of Learning and Memory **79**: 184-193.
- Rendon, E. P. y M. Robles (2000). "Activación de la familia de proteínas cinasas C." Avances y Perspectivas **20**(1): 19-29.
- Riedel, G. y K. G. Reymann (1996). "Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory." Acta Physiol Scand **157**(1): 1-19.
- Rosenblum, K., D. E. Berman, et al. (1997). "NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex." J Neurosci **17**(13): 5129-35.
- Rosenblum, K., Y. Dudai, et al. (1996). "Long-term potentiation increases tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B in rat dentate gyrus in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(19): 10457-60.
- Rossi, M. A., D. C. Mash, et al. (2005). "Spatial memory in aged rats is related to PKCgamma-dependent G-protein coupling of the M1 receptor." Neurobiol Aging **26**(1): 53-68.
- Rouse, S. T, et al. (2000). "Localization of M2 muscarinic acetylcholine receptor protein in cholinergic and non-cholinergic terminals in rat hippocampus." Neuroscience Letters **284**: 182-186.
- Rusakov, D. A., H. A. Davies, et al. (1997). "Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus." Neuroscience **80**(1): 69-77.
- Rye, D. B., C. B. Saper, et al. (1987). "Pedunculo-pontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum." J Comp Neurol **259**(4): 483-528.
- Sala, M., D. Braidà, et al. (1991). "Effect of centrally administered atropine and pirenzepine on radial arm maze performance in the rat." Eur J Pharmacol **194**(1): 45-9.

- Schulman, H. y Roberts J.L. (2003) "Intracellular Signaling" en Eichenbaum, H. Fundamental Neuroscience. L. R. B. M. C. Squire. San Diego, Academic Press: 259-298.
- Schwartzkroin, P. A., H. E. Scharfman, et al. (1990). "Similarities in circuitry between Ammon's horn and dentate gyrus: local interactions and parallel processing." Prog Brain Res **83**: 269-86.
- Schwarz, T.L. (2003) "Release of Neurotransmitters" en Eichenbaum, H. Fundamental Neuroscience. L. R. B. M. C. Squire. San Diego, Academic Press: 197-224.
- Shapiro, M. L. y H. Eichenbaum (1999). "Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons." Hippocampus **9**(4): 365-84.
- Shinoe, T., M. Matsui, et al. (2005). "Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus." J Neurosci **25**(48): 11194-200.
- Squire, L. R. (1987). Memory and Brain. New York, Oxford University Press.
- Squire, L. R. (1993). Declarative and non declarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. Memory concepts. Basic and clinical aspects. P. A. a. cols. New York, Elsevier Science: 3-25.
- Squire, L. R. y E. R. Kandel (1999). Memory. From Mind to Molecules. New York. Scientific American Library
- Squire, L. R. y M. Mishkin (1991). "Learning and memory." Brain Research Reviews **16**: 193-220.
- Squire, L. R. y S. M. Zola (1996). "Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13515-22.
- Stupien, G., C. Florian, et al. (2003). "Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice." Neurobiol Learn Mem **80**(1): 32-41.
- Sudhof, T. C. (1989). "Synaptic vesicles." Curr Opin Cell Biol **1**(4): 655-9.
- Sudhof, T. C. y R. Jahn (1991). "Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling." Neuron **6**(5): 665-77.
- Sutherland, R. J. y A. J. Rodriguez (1989). "The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory." Behav Brain Res **32**(3): 265-77.
- Thomas, L., K. Hartung, et al. (1988). "Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane." Science **242**(4881): 1050-3.
- Treves, A. y E. T. Rolls (1992). "Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network." Hippocampus **2**(2): 189-99.
- Valtorta, F., F. Benfenati, et al. (1992). "Structure and function of the synapsins." J Biol Chem **267**(11): 7195-8.
- Valtorta, F., M. Pennuto, et al. (2004). "Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis?" Bioessays **26**(4): 445-53.

- Van der Zee, E. A., J. C. Compaan, et al. (1995). "Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC gamma in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning." Hippocampus **5**(4): 349-62.
- Van der Zee, E. A. y B. R. Douma (1997). "Historical review of research on protein kinase C in learning and memory." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **21**(3): 379-406.
- van der Zee, E. A. y P. G. Luiten (1999). "Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory." Prog Neurobiol **58**(5): 409-71.
- Van der Zee, E. A., P. G. Luiten, et al. (1997). "Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **21**(3): 531-72.
- van der Zee, E. A., B. Roozendaal, et al. (1997). "Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in the amygdala--I. Cellular distribution correlated with fear-induced behavior." Neuroscience **76**(1): 63-73.
- Vizi, E. S. y J. P. Kiss (1998). "Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions." Hippocampus **8**(6): 566-607.
- Walworth, N. C., B. Goud, et al. (1989). "Mutational analysis of SEC4 suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic." Embo J **8**(6): 1685-93.
- Wick, M. R. (2000). "Immunohistology of neuroendocrine and neuroectodermal tumors." Semin Diagn Pathol **17**(3): 194-203.
- Wiebe, S. P. Stäubli U.V. y Ambros-Ingerson J. (1997). "Short-Term Reverberant Memory Model of Hippocampal Field CA3." Hippocampus **7**: 656-665.
- Wiedenmann, B. y W. W. Franke (1985). "Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles." Cell **41**(3): 1017-28.
- Woolf, N. J. (1998). "A structural basis for memory storage in mammals." Prog Neurobiol **55**(1): 59-77.

# **ANEXO**