

**Universidad Nacional Autónoma
de México**

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**EL SISTEMA CANABINÉRGICO MODULA LA
CONSOLIDACIÓN Y LA EXTINCIÓN DE LA
MEMORIA EN RATAS**

Pavel Ernesto Rueda Orozco

Tutor Principal

Oscar Próspero García

Cotutores

Ana María López Colomé

José Bargas Díaz

II. Resumen

El estudio de los sistemas de memoria ha sido de gran relevancia en el área de las neurociencias. Dos de los sistemas más estudiados hasta el momento son el sistema hipocámpal y el sistema estriatal. Estos sistemas están relacionados con el almacenamiento de diferentes tipos de información y su uso en la solución de un problema refleja la generación de diferentes estrategias. Recientemente, se ha descrito el sistema de transmisión canabinérgico. Un sistema de neuromodulación ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y con niveles particularmente altos en el hipocampo y el núcleo estriado, en donde participa en procesos plásticos relacionados con el aprendizaje y la memoria. Por otro lado, también se ha mostrado que el sistema canabinérgico varía su expresión a lo largo del ciclo luz-oscuridad, por lo que los efectos derivados de su activación podrían ser dependientes de variaciones diurnas. El primer objetivo del presente trabajo fue, determinar la participación del sistema canabinérgico en diferentes aspectos del proceso de memoria, particularmente en el proceso de consolidación y extinción de la misma. El segundo objetivo fue, determinar si la influencia del sistema canabinérgico sobre la memoria es dependiente del ciclo luz-oscuridad.

Para cumplir estos objetivos realizamos pruebas conductuales en el laberinto de Barnes y en el laberinto en "T" en diferentes puntos del ciclo luz-oscuridad bajo la administración de agonistas y antagonistas canabinérgicos directamente en el hipocampo y en el estriado de ratas. También determinamos las concentraciones del CB1 en estas estructuras a lo largo del ciclo luz-oscuridad. Finalmente determinamos la actividad de estas estructuras mediante la

técnica de c-Fos mientras los sujetos resolvían el laberinto en "T".

Los resultados muestran que los sujetos entrenados en el laberinto de Barnes, resuelven la tarea utilizando diferentes estrategias dependiendo del ciclo luz oscuridad. La expresión de estas estrategias puede modificarse mediante la administración de los canabinoides en el hipocampo o en el estriado. Además, la expresión del CB1 en el hipocampo varía a lo largo del ciclo luz oscuridad, sugiriendo un cambio en la modulación canabinérgica y por lo tanto, resultando en cambios en la conducta. Estos resultados demuestran que el sistema canabinérgico modula la consolidación de la información en una forma dependiente del ciclo luz-oscuridad, al menos en el laberinto de Barnes.

Por otro lado, los experimentos realizados en el laberinto en T muestran claramente que la activación del sistema canabinérgico en el núcleo estriado es necesaria para la extinción de memorias de procedimiento, como puede inferirse mediante la administración del antagonista al CB1 durante la extinción en esta tarea.

Los resultados de esta tesis nos permiten concluir que, el sistema canabinérgico modula la consolidación de la memoria espacial en forma dependiente del ciclo luz-oscuridad y esta modulación ocurre en el hipocampo. Por otro lado, podemos concluir que el sistema canabinérgico está implicado en la extinción de la memoria de procedimiento y este efecto ocurre en el núcleo estriado.

Por lo anterior, podemos decir que el aporte que hemos hecho al conocimiento científico es importante debido a

que, fortalece la idea que indica que la conducta exhibe variaciones diurnas y además propone un mecanismo a través del cual el medio ambiente modula esta conducta. Por otro lado abre nuevas posibilidades para estudiar al sistema canabinérgico y su potencial terapéutico en relación con la extinción de la memoria.

Agradecimientos

A mi familia:

A mi madre, *Gloria Orozco Sandoval*

A mi padre, *Eduardo Rueda Aguirre*

A mis hermanos, *Vladimir Rueda Orozco* y *Olaf Rueda Orozco*

A mi novia, esposa (pronto), amiga, confidente, soporte, compañera en la vida, y lo que podría expresar en palabras, *María Eugenia Mejía Bravo*

Me es difícil expresar algo con respecto a mi familia, el sentimiento me ciega cuando pienso en ustedes y solo alcanzo a decir: sin ustedes mi trabajo y vida serían imposibles y sin sentido, a ustedes he dedicado y dedico todo mi trabajo y esfuerzos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina y a la Facultad de Psicología por recibirme en su proyecto. Fue, es y será siempre mi gran ilusión cooperar con el engrandecimiento de mis instituciones.

A mi comité tutorial integrado por los doctores, *Oscar Próspero García*, *José Bargas Díaz* y *Ana María López Colomé*

Al grupo de Neurociencias de la Facultad de Medicina que dirige el Dr. *Oscar Próspero García* quien me guió con habilidad en mis primeros pasos en la ciencia. Siempre leal, justo y respetuoso.

A *Corinne Montes Rodríguez* y *Edgar Soria Gómez*, los estudiantes de doctorado más comprometidos, leales, sinceros y propositivos que conozco. Sin su apoyo habría huido de esta empresa sin dudarle. Gracias a ustedes se abrió ante mis ojos la real posibilidad de trabajar en equipo. En ocasiones nos preguntamos como es que los tres coincidimos en el mismo grupo, espero nunca dejar de estar en contacto.

A mis amigos en la vida

Oswaldo Gutiérrez, *Darío Torres*, *Israel Orduña*, *Liliana López*, *Julio Cortes*, *Roberto González*, *Corinne Montes* y *Edgar Soria*. Camaradas, gracias por compartir, ustedes harían cualquier pesar ligero y es mi deseo sincero aligerar sus cargas también. El orden de los nombres no significa nada, se que en todos puedo confiar en todo.

A la *familia Mejía Bravo*, quienes me han honrado al hacerme sentir como un miembro más de su familia y me han enseñado que la familia no solo esta en la sangre.

Este trabajo se realizo con el apoyo de las becas del CONACyT y DGEP-UNAM; y los donativos 49797 del CONACyT a OPG

Índice

I. Título

II. Resumen

III. Agradecimientos y Dedicatorias

IV. Índice

1. Introducción	1
2. Los sistemas de memoria	
• 2.1 Introducción a los sistemas de memoria	3
• 2.2 El hipocampo	13
• 2.3 El núcleo estriado	22
• 2.4 Conclusiones en los sistemas de memoria	29
3. El sistema canabinérgico	
• 3.1 Introducción al sistema canabinérgico	30
• 3.2 El receptor a canabinoides 1	41
1. Distribución y localización	
2. Acoplamiento a proteínas G	
3. Regulación de adenilato ciclasa	
4. Regulación del AMPc	
5. Regulación de canales iónicos	
• 3.3 Canabinoides endógenos	34
1. Generalidades moleculares	
2. Anandamida	
• 3.4 El sistema canabinérgico en el hipocampo	38
1. El sistema canabinérgico, transmisión glutamatérgica hipocampal	
2. El sistema canabinérgico, transmisión GABAérgica hipocampal	
3. Evidencia conductual de la participación del sistema canabinérgico en la función hipocampal y la memoria	
• 3.5 El sistema canabinérgico en el núcleo estriado	52

1. El sistema canabinérgico, transmisión GABAérgica hipocampal
2. El sistema canabinérgico, transmisión glutamatérgica hipocampal

4. Variaciones diurnas

- 4.1 Variaciones diurnas en el CB1 y los endocannabinoides **59**
- 4.2 Variaciones diurnas en la conducta **60**

5. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos

- 5.1 Experimento 1, planteamiento del problema e hipótesis **63**
- 5.2 Experimento 2, planteamiento del problema e hipótesis **64**
- 5.3 Objetivos **65**
 1. Objetivos experimento 1
 2. Objetivos experimento 2

6. Método

- 6.1 Sujetos **66**
- 6.2 Aparatos **66**
- 6.3 Fármacos **67**
- 6.4 Cirugía **68**
- 6.5 Procedimientos **69**
 1. Laberinto de Barnes
 2. Laberinto en cruz
 3. Determinación del CB1

7. Resultados

- 7.1 Experimento 1 **83**
 1. Entrenar a ratas en dos puntos del ciclo luz-oscuridad (13:00 y 01:00) en el laberinto de Barnes para replicar los datos obtenidos durante la licenciatura y mostrar que existe una variación diurna en la expresión de estrategias.
 2. Administrar ANA y un antagonista del CB1 (AM251) en el hipocampo y el estriado y valorar sus efectos en la ejecución en el laberinto de Barnes en ambas fases del ciclo luz-oscuridad.

3. Realizar la cuantificación de proteínas y ARNm en el hipocampo y el núcleo estriado durante el ciclo luz-oscuridad.	
• 7.2 Experimento 2 100
1. Entrenar a ratas en el laberinto en cruz y verificar sus curvas de extinción, además correlacionar la actividad del estriado con el aprendizaje y la extinción en el laberinto en cruz mediante la técnica de c-Fos	
2. Administrar un antagonista del CB1 en el estriado dorsolateral durante la fase de extinción en el laberinto en cruz	
3. Administrar un antagonista del Cb1 en el hipocampo durante la fase de extinción en el laberinto en cruz.	
8. Discusión y conclusiones	
• 8.1 Experimento 1 113
• 8.2 Experimento 2 121
• 8.3 Conclusiones generales 127
9. Referencias 128
10. Anexos 141
• 10.1 Anexo 1, Rueda-Orozco y col, 2007	
• 10.2 Anexo 2, Rueda-Orozco y col, en prensa	
• 10.3 Anexo 3, Rueda-Orozco y col, 2006	

1. Introducción

Cuando un sujeto normal sale a las calles, está equipado con un grupo de herramientas físicas y mentales que le permitirán enfrentar las contingencias diarias. Sin embargo, la cotidianidad de nuestras vidas hace complicado percatarnos de la importancia de las diferentes funciones que componen nuestro aparato intelectual. El entrenamiento al que hemos estado sometidos desde nuestro nacimiento para controlar a la perfección cada una de las partes de nuestro cuerpo, hace que percibamos nuestras capacidades como un ente compacto, sin posibilidad de dividirse, todos los días limamos los bordes que componen nuestra persona.

Es casi imposible imaginar cómo serían nuestras vidas si de pronto la integridad de nuestro organismo se viera coartada, sin un brazo, sin la visión o la audición, y es aún más complicado imaginar cómo serían nuestras vidas si le faltara algún componente a nuestra mente. ¿Cómo seríamos si conociéramos las palabras pero no pudiéramos articularlas?

El estudio de la memoria se ha visto beneficiado por los desafortunados casos de pacientes que han perdido, por diferentes circunstancias, alguna parte de su cerebro. El principal ejemplo es el paciente HM, sujeto al que se le practicó una cirugía de extirpación de gran parte de los lóbulos temporales (incluyendo el hipocampo) dando como resultado la pérdida de importantes funciones de la memoria pero dejando intactas otras.

El caso del paciente HM representa el evento que marcó el despunte del estudio de la memoria. Sus síntomas particulares demostraron que el sistema de memoria estaba dividido en subsistemas que se encargan de diferentes aspectos de la información, de su almacenamiento y de su recuperación. Desde entonces cientos de artículos se han publicado al respecto y cientos de grupos de trabajo se han dedicado a esclarecer cómo es que funciona la memoria. El proyecto que decidimos realizar tiene que ver con los mecanismos fisiológicos de la memoria. Para esto elegimos dos modelos de memoria utilizados por varios grupos de investigación, el laberinto de Barnes y el

laberinto en T. También evaluamos la participación de dos estructuras involucradas en diferentes tipos de memoria, el hipocampo y el núcleo estriado. Adicionalmente decidimos manipular un sistema de neurotransmisión que día a día va adquiriendo más importancia en la comunidad científica, el sistema canabinérgico. Por último decidimos evaluar las variables anteriores en función al ciclo luz oscuridad.

En resumen, los principales descubrimientos que surgieron del trabajo fueron que, los sujetos adquieren la tarea del laberinto de Barnes de forma dependiente del ciclo luz oscuridad. Este descubrimiento apoya otros experimentos previamente realizados con hipótesis similares (Chaudury y Colwell, 2003; Ralph y col, 2002). Además, como hemos dicho, el sistema canabinérgico varía su expresión a lo largo del ciclo luz oscuridad, por lo que mi estudio complementa experimentos anteriores en nuestro grupo y el de otros (Martínez-Vargas y col, 2003; Valenti y col, 2004; Murillo-Rodríguez y col, 2006) donde se propone al sistema canabinérgico como dependiente de variaciones diurnas. Otro descubrimiento es que los efectos de la activación del sistema canabinérgico en estructuras específicas son diferentes dependiendo del ciclo luz oscuridad. Adicionalmente también analizamos la participación del sistema canabinérgico en la extinción de la memoria en el laberinto en T, los resultados demuestran que la inhibición del sistema canabinérgico en el núcleo estriado retrasa el proceso de extinción en forma dosis dependiente.

2. Los sistemas de memoria

2.1 Introducción a los sistemas de memoria

Al comenzar a hablar de la memoria y el aprendizaje no se puede evitar llegar a conclusiones básicas, como su importancia en el desarrollo de la cultura y la humanidad, la función que juega en la cotidianidad de todos los seres humanos. Lo desesperante que resulta no recordar en dónde hemos dejado las llaves o lo devastador que sería no poder recordar quiénes somos o quiénes son nuestros parientes más cercanos son ejemplos simples de lo importante de este sistema. Desde mi punto de vista cualquiera de nosotros podría resumir adecuadamente las consecuencias de perder la capacidad de memorizar, recordar o aprender.

Las definiciones de memoria generalmente vienen acompañadas por una definición de aprendizaje debido a que son procesos altamente relacionados. En el capítulo de memoria del libro Principios de Neurociencia, Kandel, Kupfermann y Iversen definen al aprendizaje como “el proceso mediante el cual adquirimos conocimiento acerca del mundo mientras que la memoria es el proceso mediante el cual el conocimiento es codificado, almacenado y más tarde recuperado” (Kandel, 2000). Por su parte Badeley define a la memoria como “un sistema para el almacenamiento y la recuperación de información” (Badeley, 1998). Richard Thompson define al aprendizaje y la memoria como “Los cambios duraderos en la conducta resultantes de la experiencia” (Thompson, 1986). En estos casos quizá lo mejor sea apegarse al concepto más simple. La memoria puede considerarse como un almacén de información. A su alrededor podemos encontrar diferentes procesos y eventos que deben ocurrir para que la información sea almacenada. Es bien aceptado que el proceso de memoria abarca al menos tres fases, la adquisición de la información, el almacenamiento o consolidación y la recuperación. En el sentido más estricto la memoria solo sería el almacén de los recuerdos, sin embargo este sería inexistente sin los procesos que le llevan y recuperan la información de él. En la figura 2.1 podemos observar un modelo simplificado de esta idea.

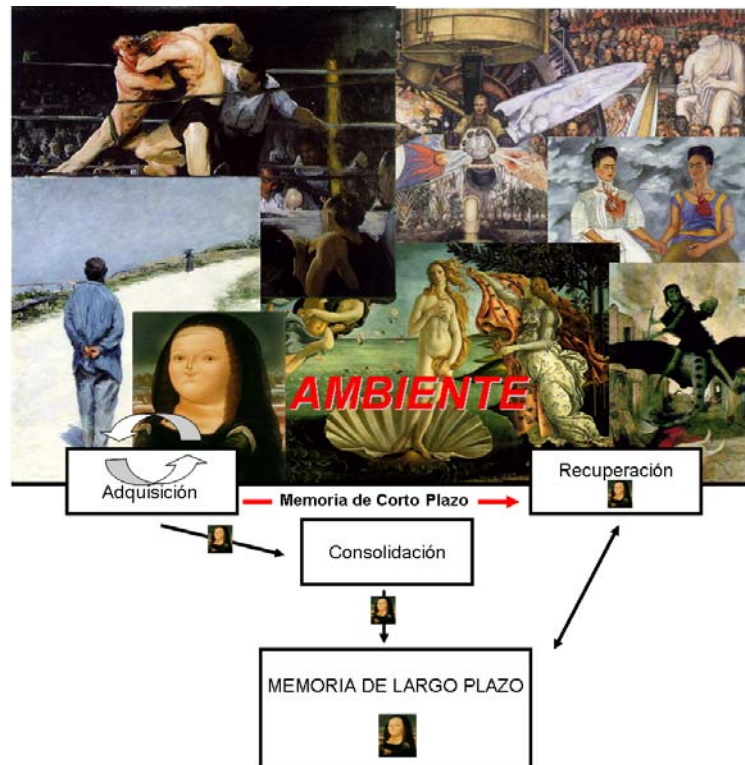


Figura 2.1 En esta figura se observa un modelo de la interacción de la memoria con el medio ambiente, la adquisición es el primer paso en que la información ambiental contacta al sujeto, la información está entonces en el almacén de corto plazo y puede ser fácilmente recuperada por un periodo limitado de tiempo, La información puede pasar al almacén de largo plazo en donde permanece por periodos indeterminados de tiempo.

Este sencillo modelo más que un modelo de memoria, trata de mostrar el mensaje del sujeto dentro de un ambiente que constantemente lo bombardea de información, de alguna forma el sistema logra centrar su atención en estímulos particulares que forman parte del medio ambiente complejo y los lleva al cerebro, donde son transportados al almacén de memoria a través del proceso de consolidación para después ser recuperados en las condiciones ambientales adecuadas.

El concepto de **consolidación de la memoria** ha sido atribuido a los psicólogos alemanes Müller y Pilzecker (para revisión Lechner y col, 1999; McGaugh, 2000). Supone que cuando la información llega al sujeto receptor no pasa a formar parte del bagaje de recuerdos del individuo inmediatamente, sino que tiene que pasar por el proceso de consolidación para llegar al almacén de largo plazo o permanente. Esto nos lleva a otro concepto fundamental en el estudio de la memoria, la distinción entre la **memoria de corto plazo** y la

memoria de largo plazo. Se ha propuesto que la información antes de ser consolidada (llegar al almacén de largo plazo) permanece en el “almacén de corto plazo”. Esta información que aún no ha pasado por la fase de consolidación se encuentra en un periodo en el cual es susceptible de ser olvidada. El almacén de largo plazo representa el fin del estadio de corto plazo. Una vez que la información está en la memoria de largo plazo ya no se encuentra en estado de labilidad para ser olvidada.

En la figura 2.2 muestro una ilustración tomada de McGaugh (2000) en donde se esquematiza la temporalidad de los recuerdos. Este autor hace una distinción entre la memoria de corto plazo que va de algunos minutos a horas, la información de largo plazo que va de horas a meses y la información de más largo plazo que aparentemente no será olvidada.

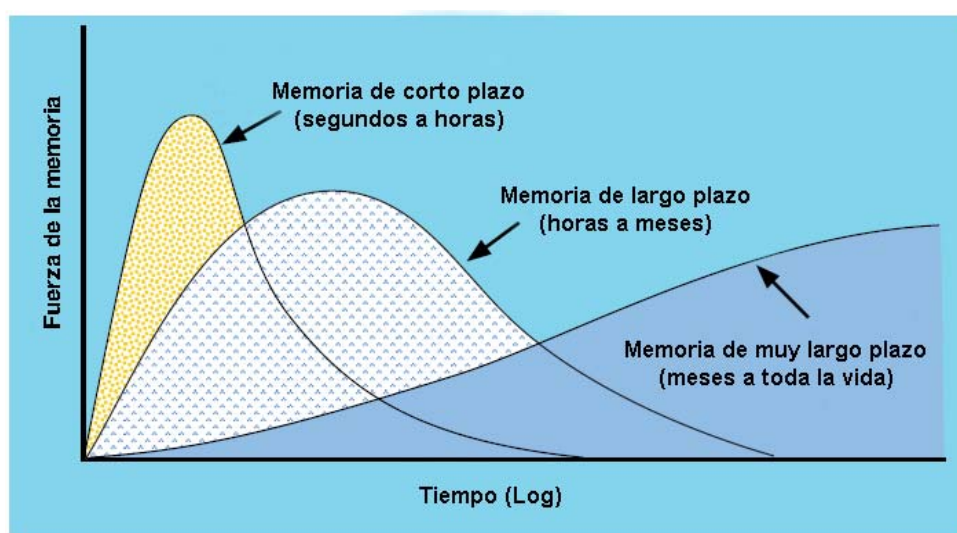


Figura 2.2 Modelo de la temporalidad de la memoria tomado de McGaugh 2000, puede observarse que la memoria de corto plazo permanece con nosotros por algunos minutos y hasta algunas horas, periodo en que la información es lábil a ser olvidada. La memoria a largo y muy largo plazo va de horas a años.

En este modelo se propone que la información tiene que someterse a una serie de pasos hasta ser recuperada. En el caso de la memoria de largo plazo la información primero tiene que llegar al sujeto, después ser consolidada y finalmente recuperada. En el caso de la memoria de corto plazo la información tiene que llegar al sujeto y no ingresar a la fase de consolidación, sino saltar directamente a la fase de recuperación.

Esto supone que es imposible recuperar información del sistema que jamás haya entrado a él. También supone que el proceso de almacenamiento de memoria es lineal, es decir, después de que la información es presentada pasa al almacén de corto plazo y después al de largo plazo. Existe evidencia que revisaré mas adelante, que sustenta la idea que cada uno de estos pasos es independiente y que diferentes estructuras cerebrales están involucradas.

Los estudios clave de Müller y Pilzecker se centraron en el concepto de consolidación de la memoria. En sus diseños experimentales pedían a los sujetos que aprendieran diversas listas de palabras y después de algún tiempo se les pedía que recuperaran esa información. Una de las primeras observaciones importantes es que en los periodos entre la presentación de la información y la recuperación de la misma, los sujetos reportaban lo que se denominó “perseverancia de la información”; es decir, los sujetos mantenían presente en su mente la información que debería ser recuperada, sugiriendo algún tipo de reverberación en sus cerebros.

De acuerdo con lo anterior, interferir con la perseverancia resulta en un deterioro en la recuperación, lo que sugirió a los investigadores que “distraer al cerebro de su tarea de perseverancia le impedía llevar la información al largo plazo”. Finalmente, también pudieron determinar que existía un periodo crítico de tiempo en que la interferencia era efectiva (10 minutos aprox. en sus condiciones experimentales). Tratar de interferir con la perseverancia después de este periodo de tiempo no dio lugar al deterioro de la memoria. Estas evidencias fueron la base para el pensamiento actual que indica que después de la presentación de la información diferentes eventos ocurren en el cerebro que son indispensables para llevar la información del almacén de corto al de largo plazo. Actualmente es bien aceptado que estos eventos son de tipo molecular e involucran la activación de genes, la síntesis de nuevas proteínas y la reestructuración de las sinapsis (para revisión Lamprecht y LeDoux, 2004).

Además de los conceptos de consolidación de la memoria, y memoria de corto y largo plazo, otro pilar fundamental en el estudio de la memoria ha sido el concepto de diferentes sistemas de memoria. La idea fundamental es que

en el cerebro existen diferentes sistemas de memoria encargados de almacenar diferentes tipos de información. Esta idea fue propuesta por Larry Squire y es ampliamente aceptada. Supone que existen diferentes tipos de memoria divididos en dos grandes tipos, la memoria *Declarativa* o explícita y la memoria *No Declarativa* o implícita. La figura 2.3 muestra un esquema de la clasificación principal de la memoria y sus subdivisiones.

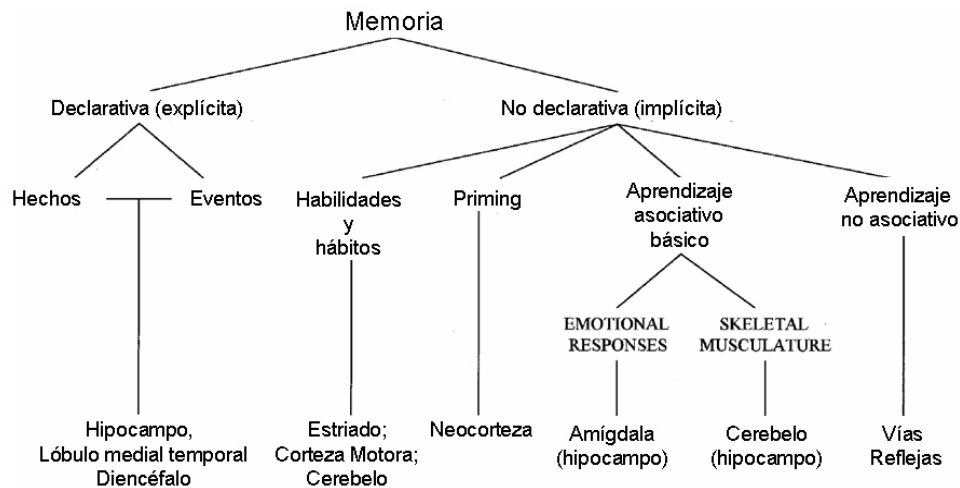


Figura 2.3 La clasificación clásica de la memoria por Larry Squire, tomado de Squire y col, 2001. En general se reconocen dos principales tipos de memoria, la declarativa y la no declarativa. Se hace énfasis en las estructuras cerebrales potencialmente relacionadas con cada tipo de memoria.

Se ha mostrado que la memoria declarativa está relacionada con el hipocampo y el lóbulo temporal mientras que la memoria no declarativa está relacionada con el estriado, la corteza cerebral, el cerebelo, la amígdala y las vías reflejas.

Memoria Declarativa. La memoria declarativa se refiere al almacenamiento de recuerdos relacionados con hechos, eventos, lugares, fechas, nombres y situaciones. Se refiere también al recuerdo de la experiencia personal, reconocimiento de escenas y objetos familiares. Muchos investigadores están de acuerdo en llamarla la memoria del “qué”.

La principal evidencia de la existencia de la memoria declarativa como un sistema de memoria independiente se presentó en la década de los 50's cuando Scoville y Milner (1957) presentaron por primera vez el caso del

paciente H.M., un hombre que se volvió amnésico después de una cirugía donde se le extirpó gran parte del lóbulo temporal incluyendo el hipocampo, con el objeto de controlar su epilepsia.

Después de la cirugía H.M. presentaba un coeficiente intelectual normal y su memoria de trabajo y su memoria de procedimiento se encontraban en condiciones normales; sin embargo, su memoria declarativa se encontraba dañada. El paciente no presentaba problemas para recordar eventos que ocurrieron antes de la cirugía, es decir, su memoria retrógrada estaba en perfectas condiciones. H.M. era incapaz, sin embargo, de crear nuevos recuerdos de tipo declarativo; es decir, presentaba un daño en su memoria anterógrada declarativa. Este caso clínico representó la primera prueba de la división entre al menos dos sistemas de memoria independientes, la memoria declarativa, severamente dañada en un paciente sin hipocampo que conservaba sin menoscabo ni deterioro de ningún tipo su memoria no declarativa. También pudo observarse en el paciente la necesidad de una estructura encargada de llevar la información desde la memoria de corto plazo (H.M. tenía memoria de corto plazo) a la memoria de largo plazo.

A partir de este estudio surgieron diversos modelos animales en los que se trató de reproducir las condiciones de H.M. Por ejemplo se crearon modelos en monos (Mishkin, 1982) en los cuales pudo confirmarse la propuesta de que el lóbulo temporal era responsable de la memoria declarativa (Squire y Zola-Morgan, 1991). Este modelo fue llevado después a la rata obteniendo resultados similares (para revisión Burwell y col, 1995; Bunsey y Eicheimbaum, 1996). Desde entonces el hipocampo y algunas cortezas adyacentes como la corteza entorrinal, perirrinal, y parahipocampal han sido el principal blanco para los estudios de memoria de tipo declarativa. En la figura 2.4 se observa un esquema tomado de Squire y col, 2004, en donde se ilustran estas estructuras en el cerebro de rata, mono y humano y se esquematiza la comunicación entre ellas.

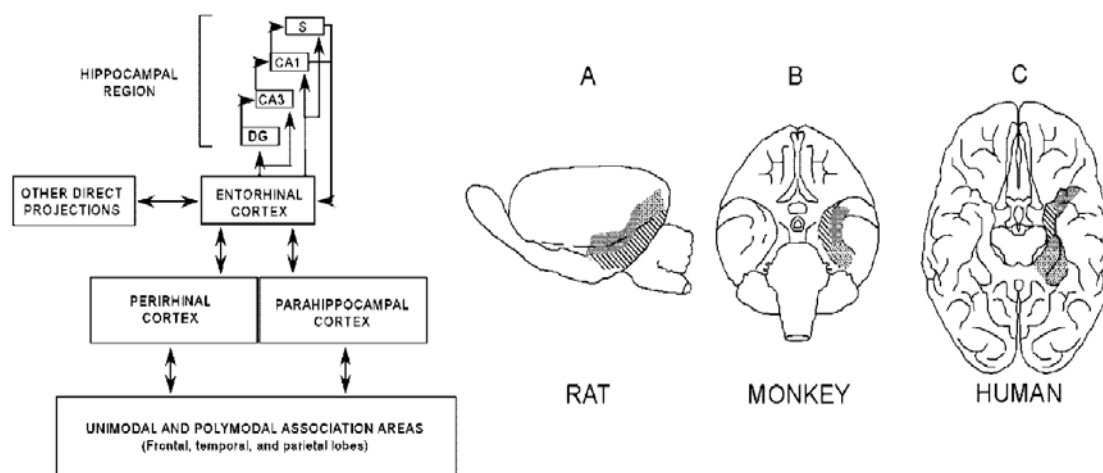


Figura 2.4 Se reconoce a la formación hipocámpica como la responsable de la memoria declarativa. Se observa la conectividad interna hipocámpica y su comunicación con otras áreas del cerebro como la corteza entorrinal de donde la información pasará a otras cortezas como la peririnal, para-hipocámpica y áreas asociativas. Se esquematiza en gris la posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata (A), mono (B) y humano (C). Se ha mostrado que en las tres especies la memoria declarativa puede dañarse al interferir con la funcionalidad de estas áreas.

La memoria espacial se considera como una forma de memoria de tipo declarativa (Eichenbaum, 1999; Squire y col, 2004) por lo que dentro de los modelos de memoria declarativa en ratas se encuentran los laberintos espaciales, entre los más utilizados se encuentran el *laberinto acuático de Morris*, el *laberinto en "T"*, el *laberinto radial de ocho brazos*, el *laberinto de Barnes* entre otros.

Memoria No Declarativa. La memoria no declarativa es el otro gran tipo de memoria dentro de la clasificación clásica de la memoria. A diferencia de la memoria declarativa, la memoria no declarativa está distribuida en una mayor cantidad de estructuras cerebrales y puede a su vez dividirse en diferentes tipos. Los principales ejemplos de memoria no declarativa son *la memoria de procedimiento* que se encuentra relacionada con el estriado, la corteza motora y el cerebelo. *El aprendizaje asociativo básico* donde podemos distinguir el aprendizaje de respuestas emocionales modulado principalmente por la amígdala (para revisión Maren y Quirck, 2004) y por otro lado el aprendizaje en el músculo esquelético donde el principal participante es el cerebelo (para revisión Thompson, 2005). Con respecto a la memoria no declarativa, en este

trabajo me enfoqué principalmente en el núcleo estriado, de tal manera que revisaré principalmente las evidencias que impliquen al núcleo estriado y a la memoria de procedimientos y secuencias.

El aprendizaje de este tipo de información ocurre gradualmente como consecuencia del entrenamiento. También se le conoce como la memoria del “cómo” y ha podido observarse que en pacientes con amnesia del lóbulo temporal este tipo de memoria se mantiene intacta (Knowlton y Squire, 1996). Una característica fundamental de este tipo de memoria es que no requiere de una recuperación consciente de la información (Squire y Zola, 1996), es decir el sujeto no requiere poner atención y a pesar de esto puede recuperar la tarea, como en el caso de la conducción de un automóvil mientras mantenemos una conversación.

Diversos estudios confirman que la memoria no declarativa puede permanecer intacta cuando la memoria declarativa se encuentra deteriorada, y que su aprendizaje puede ocurrir sin necesidad de poner atención directamente a lo que se tiene que aprender. El tipo de aprendizaje de procedimientos ha sido altamente relacionado con circuitos cortico-estriatales, y existen algunas evidencias que demuestran que pacientes con enfermedad de Huntington o de Parkinson, ambas caracterizadas por una disfunción en los núcleos de la base, son incapaces de aprender tareas de procedimiento (Knowlton y Squire, 1996). Sin embargo, no tienen ningún problema para adquirir tareas de tipo declarativo.

El estudio de las funciones de los núcleos de la base ha sido llevado a modelos animales (para revisión Packard y Knowlton, 2002) y se han podido establecer correlatos entre lo observado en humanos y los modelos animales. Por ejemplo, se ha demostrado que el desempeño en una tarea de formación de hábitos es selectivamente dañado en monos con lesiones estriatales (Fernández-Ruiz y col, 2001). Por otro lado, existen numerosas evidencias de que los núcleos de la base también son responsables del aprendizaje de hábitos en ratas (Packard et al, 1989; McDonald y White 1993; Packard y Theather 1998; Jog y col, 1999) pero también de otro tipo de tareas de

aprendizaje como la prevención pasiva (Prado-Alcala y col, 1975), aprendizaje de discriminación por condicionamiento visual (Reading y col, 1991) o por condicionamiento auditivo (Adams y col, 2001).

Se ha propuesto que en el aprendizaje, una de las funciones de los núcleos de la base es el establecimiento de asociaciones de tipo Estímulo-Respuesta (E-R). Este concepto proviene de los estudios en psicología realizados a mediados del siglo XX. En aquel entonces Hull (1943) propuso que la conducta estaba compuesta del encadenamiento de asociaciones del tipo E-R. Más adelante a través de varios estudios en rata se comprobó que el estriado estaba relacionado con este tipo de aprendizaje (Packard y col, 1989; McDonald y White 1993; Packard y Theather 1998; Jog y col, 1999) y que además era independiente del aprendizaje del que se encargaba el hipocampo.

Disociación de funciones entre el hipocampo y el estriado. Muchos de los conceptos que actualmente son la base de los estudios de memoria provienen del pensamiento de psicólogos como Thurndike, Tolman, Hull, Skinner o Pavlov. Entre estos conceptos se encuentran los de aprendizaje estímulo-respuesta (E-R) y estímulo-estímulo (E-E) que he tomado como base importante de mi proyecto. De estos antecedentes surgió la idea de que el aprendizaje en una tarea espacial (laberinto en T, por ejemplo) podía ocurrir en dos formas, mediante asociaciones de tipo E-E y E-R, esto es, el sujeto podía hacer un “mapa” mediante asociaciones entre estímulos neutros que no indicaban precisamente el lugar a donde debería dirigirse (E-E) o bien podía simplemente dar una respuesta (ejemplo, girar al lado derecho) ante un estímulo específico (E-R). En algunos estudios clásicos Tolman demostró que tanto las ratas como los humanos eran capaces de ambos tipos de aprendizaje (Tolman y col, 1946; Tolman, 1948).

Varios años después de los descubrimientos de Tolman y gracias al contexto de los diferentes sistemas de memoria observados en pacientes humanos, se realizaron experimentos para producir un modelo en ratas. En la figura 2.5 se muestra la ilustración del estudio clásico de Packard y col. (1989) en donde se muestra un modelo de doble disociación entre las funciones del

estriado y las del hipocampo. Estos autores diseñaron un experimento en el laberinto radial de ocho brazos en el que un grupo de ratas fue lesionado en el núcleo estriado; mientras que otro grupo fue lesionado en la fimbria fornix, además de un grupo control. Los tres grupos fueron entrenados en dos versiones distintas de la tarea que se observan en los paneles b y c de la figura 2.5. En la primera versión de la tarea (Figura 2.5 b) se presentaba alimento en los 8 brazos del laberinto y se consideraba como un error visitar un brazo que ya había sido visitado, de tal forma que las ratas tenían que recordar los lugares que ya habían visitado, en cierta forma el sujeto tenía que hacer un mapa de los lugares que ya había visitado (asociación E-E). En la segunda versión de la tarea (Figura 2.5 c) el alimento se presentó únicamente en los lugares que estaban señalados por una luz, en este caso se consideraba como un error visitar un brazo que no estuviera marcado por la luz de tal forma que el sujeto sólo tenía que recordar una asociación entre la luz y el reforzador o dar una respuesta de acercamiento (asociación E-R).

Los resultados de este estudio mostraron que los sujetos con lesiones en el fórnix no podían resolver la primera versión de la tarea (E-E) pero los sujetos con lesiones en el estriado si (Figura 2.5 d). Por otro lado en la versión E-R, los sujetos con lesiones en el estriado eran incapaces de resolver la tarea mientras que los lesionados en el fórnix podían resolver la tarea muy bien (Figura 2.5 e). Esto demostró por primera vez en ratas una disociación entre el papel del hipocampo y el estriado para dos diferentes tipos de memoria, el hipocampo en tareas de tipo E-E y el estriado en tareas de tipo E-R. Más adelante se consideró también a las tareas de tipo E-E como memoria declarativa y a las de E-R como no declarativa.

Los resultados obtenidos en el laberinto radial fueron replicados mas adelante en el laberinto acuático de Morris (McDonald y White, 1994) y el laberinto en T (Packard y McGaugh, 1996).

En este proyecto decidimos enfocarnos en la disociación entre el estriado y el hipocampo en una tarea espacial en ratas por lo que las siguientes secciones estarán dedicadas al funcionamiento de estas dos estructuras.

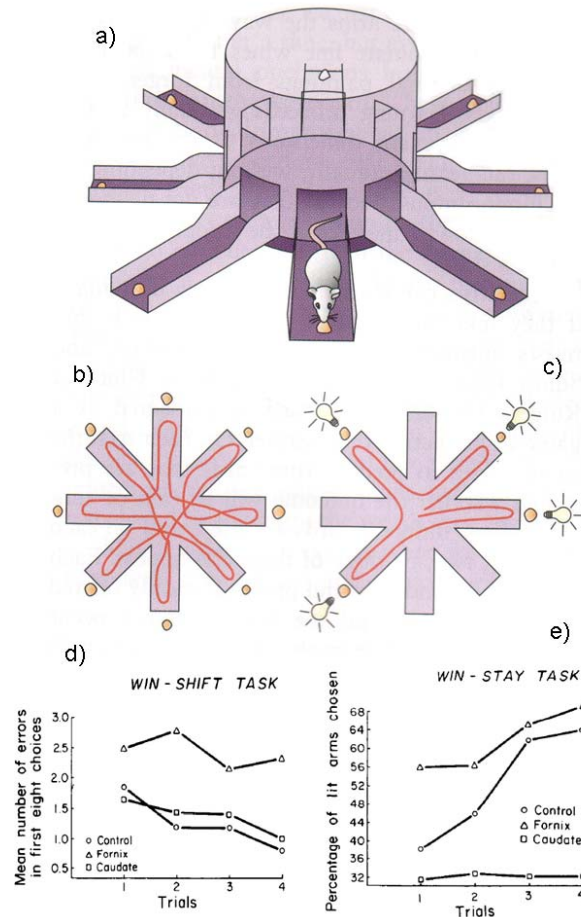


Figura 2.5 (a) Esquema del laberinto radial de ocho brazos. (b) Versión E-E de la tarea en donde se entregan reforzadores en cada uno de los brazos del laberinto. (c) Versión E-R de la tarea en donde solo se entregan reforzadores en donde esta presente el estímulo luminoso. (d y e) Desempeño de las ratas control (círculos abiertos) lesionados en el fornix (triángulos abiertos) y en el estriado (cuadrados abiertos) en la versión E-E (d) y E-R (e). Note como el número de errores es mayor para los lesionados en el fornix que en los controles o en los lesionados en el estriado en la versión E-E (d). Note como el porcentaje de respuestas correctas (elección de brazos iluminados) es menor para las ratas con la lesión estriatal que para los sujetos control o lesionados en el fornix. Tomada de Packard y col (1989).

2.2 El Hipocampo

El hipocampo en humanos mide 5 centímetros (Pruessner y col, 2000) aproximadamente, mientras que en la rata mide alrededor de 4 milímetros (Paxinos y Watson, 1986). En esta descripción nos enfocaremos al hipocampo de rata que es donde se realizaron los estudios.

En la rata el hipocampo tarda aproximadamente 21 días en formarse (para revisión Wis y van Groen, 1989) y se extiende desde el septum dorsal hasta la parte caudal de la amígdala en la región ventral del cerebro y tiene la forma de una nuez de la india. Se puede dividir al hipocampo en el hipocampo dorsal o septal y en el hipocampo ventral o temporal.

El hipocampo está dividido en diferentes regiones de acuerdo con los diferentes tipos de células que pueden encontrarse en él y por su posición en el espacio. En la figura 2.6 se muestra el dibujo realizado por Santiago Ramon y Cajal en donde se muestran las diferentes regiones del hipocampo así como sus principales tipos de células. Se ha reconocido que el hipocampo esta dividido en la región del “Cuerno de Amón” o “Cornus Ammonis” (CA) el Giro Dentado (GD) y el Subiculum (SB). La región de CA está subdividida en CA1, CA2, CA3, CA4 y el subiculum. La fascia dentata esta dividida en el giro dentado (GD) y el hilus (HL).

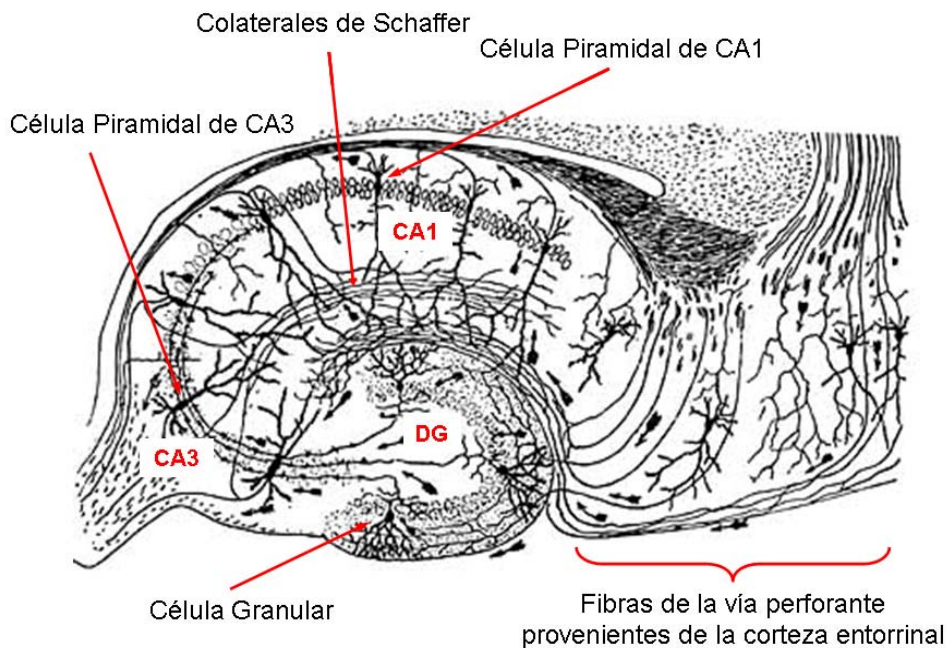


Figura 2.6 Muestra el dibujo original de Ramon y Cajal representando la formación hipocampal y algunas de sus células. Se han insertado algunos indicadores para señalar las diferentes regiones y algunas células.

Las células principales en las regiones de CA1, CA2 y CA3 son las piramidales, mientras que en el GD las células principales son las células granulares, todas estas son de naturaleza glutamatérgica. Como se observa en

la figura 2.7 la organización celular del hipocampo es relativamente simple. Consiste en una capa principal de neuronas en la región de CA conocida como “*stratum pyramidale*” (p en la figura 2.7) las cuales proyectan sus dendritas apicales a una zona con una baja densidad celular conocida como el “*stratum lacunosum moleculare*” (lm en la figura 2.7) y el “*stratum radiatum*” (r en la figura 2.7). Por otro lado en el GD la capa principal de neuronas se conoce como capa de células granulares o “*stratum granulosum*” (g en la figura 2.7) y proyectan sus dendritas apicales a la región conocida como el “*stratum moleculare*” (m en la figura 2.7).

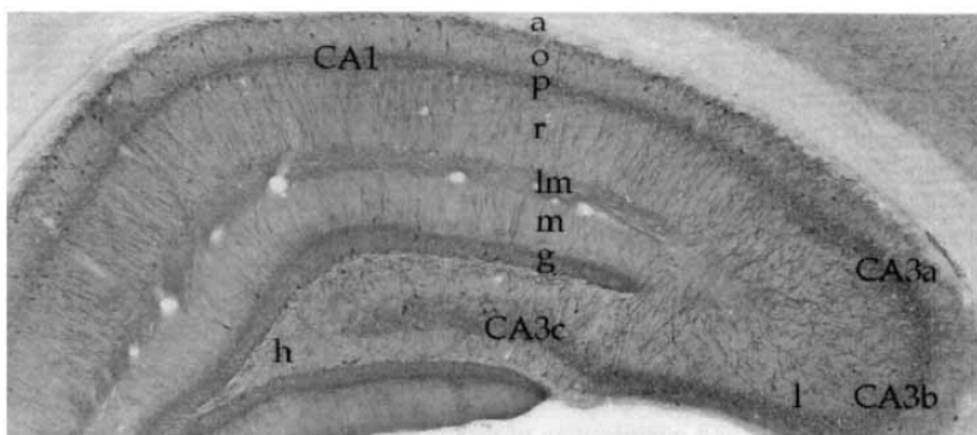


Figura 2.7 Corte coronal mostrando el hipocampo de rata. Se observan las distintas regiones del hipocampo así como las distintas capas en las que se ha dividido. Stratum oriens (o); stratum pyramidale (p); stratum radiatum (r); stratum lacunosum moleculare (lm); stratum moleculare (m); stratum granulosum (g). Tomado de Buszaki, 2002.

Se reconoce que intrínsecamente el hipocampo está conectado en el denominado “circuito trisináptico”. Este circuito se compone de tres grupos de sinapsis que se observan en la figura 2.8. La primera sinapsis ocurre entre las proyecciones que provienen de la corteza entorrinal a través de la vía perforante y las células granulares del giro dentado. Las células granulares a su vez proyectan hacia las células piramidales de CA3 a través de las fibras musgosas. Por último, las células piramidales de CA3 proyectan hacia las células piramidales de CA1 a través de las fibras colaterales de Schaffer, en general estas fibras hacen sinapsis en la región del stratum radiatum y stratum oriens en donde se encuentran las dendritas de las células piramidales de CA1. Las neuronas piramidales de CA1 envían sus proyecciones de regreso a la corteza cerebral a través del subiculum.

Anatómica y electrofisiológicamente el GD representa es la principal región de entrada al hipocampo, las proyecciones principales al dentado se originan en la corteza entorrinal. La capa II de la corteza entorrinal es el origen de las proyecciones masivas a la región del GD y CA3 mientras que la capa III representa el origen de las proyecciones a CA1 (Steward and Scoville, 1976). El complejo del septum y la banda diagonal de Broca son otra importante proyección hacia el hipocampo (Amaral y Kurz, 1985), las células en estos núcleos proveen al hipocampo de acetilcolina.

El hipocampo proyecta a varias regiones corticales y subcorticales, y su principal región de salida es el subiculum y la región de CA1. Proyecta principalmente hacia la corteza entorrinal, el septum, el núcleo acumbens, la amígdala y el hipotálamo (para revisión Witter 1989).

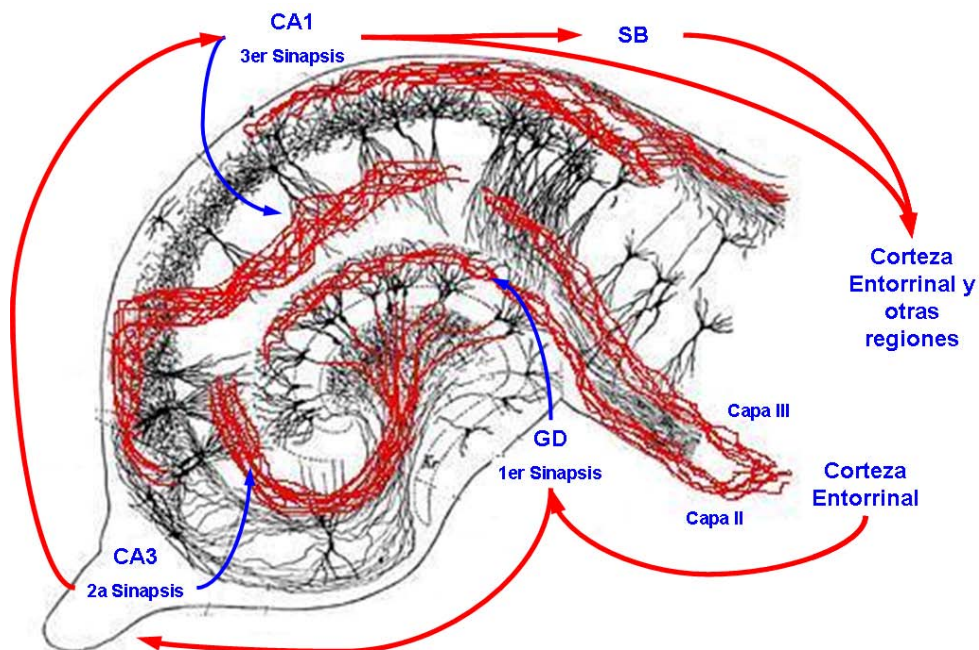


Figura 2.8 En esta figura se ejemplifica el circuito trisináptico, los axones de proyección están indicados en rojo. La información llega principalmente desde la corteza entorrinal y hace la primera sinapsis en las dendritas de las células granulares de giro dentado, después la información se proyecta a través de las fibras musgosas hacia las dendritas de las células piramidales de CA3 donde ocurre la segunda sinapsis para después proyectarse hacia la región de CA1 a través de las colaterales de Schaffer donde ocurre la tercer sinapsis. La información fluye después hacia la corteza entorrinal, otras cortezas y otras regiones subcorticales a través del subiculum.

Además de las células piramidales, el hipocampo cuenta con una red de interneuronas que modulan el funcionamiento de las células principales. Entre sus principales funciones se encuentra la coordinación de ritmos entre poblaciones neuronales y procesos plásticos relacionados con memoria (para revisión Freund y Buzsáki, 1996). Existen diferentes tipos de interneuronas en el hipocampo, todas son de naturaleza GABAérgica y se diferencian por algunas características morfológicas, por donde se encuentran colocadas y por algunas características químicas y moleculares.

Entre las principales interneuronas que podemos encontrar en el hipocampo están las “*células de candelabro o axo-axónicas*” (Fig 2.9 a), las interneuronas de canasta (Fig 2.9 b) y las “*interneuronas inhibitoras de dendritas*”. (Fig 2.9 c). Hemos mencionado solo algunos de los tipos de interneuronas que se encuentran en el hipocampo, pero la diversidad es mucho mayor. Para una revisión exhaustiva del tema dirigirse a Freund y Buzsáki, 1996.

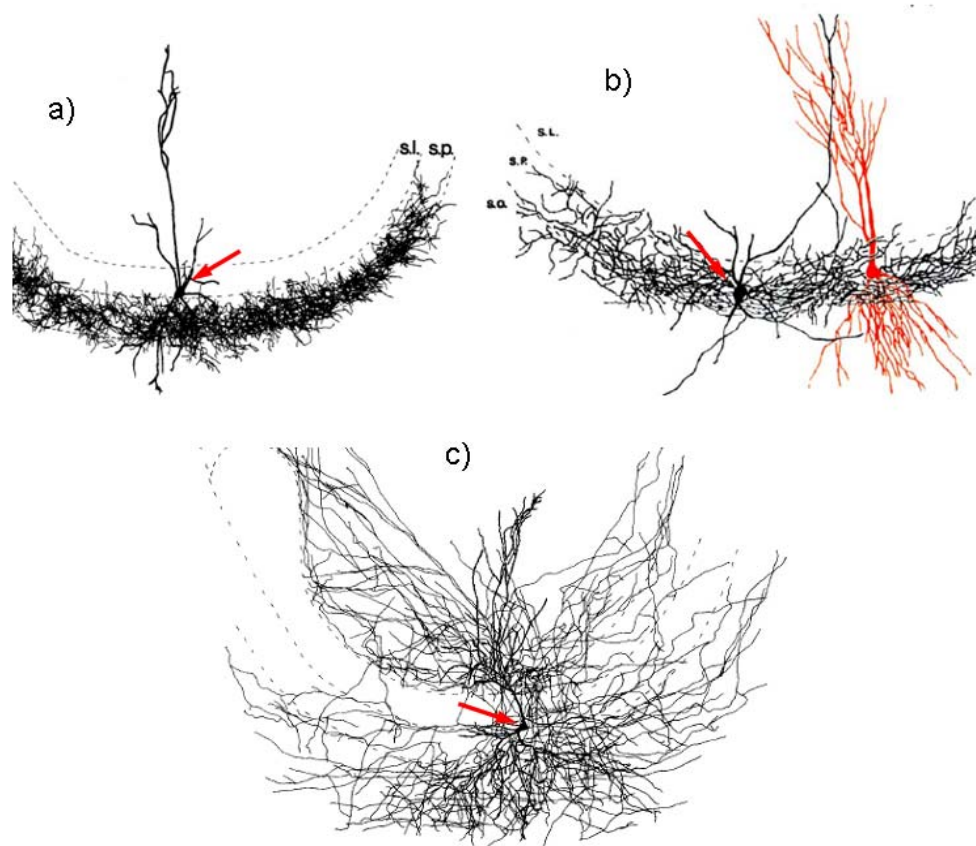


Figura 2.9 Muestra la reconstrucción de tres interneuronas en la región de CA3 del hipocampo (Figura reconstruida a partir de Freund y

Buzsáki, 1996). Las flechas rojas indican el cuerpo de la neurona. (a) Neurona de candelabro, su axon se extiende en una rama única hacia el stratum lacunosum moleculare y radiatum. (b) Ínterneurona de canasta, inerva la región perisomática de la neurona piramidal (en rojo) pero también sus dendritas. (c) Ínterneurona inhibitoria de dendritas su axón presenta varias colaterales que se extienden a varias capas del hipocampo.

Neurotransmisores en el hipocampo

El hipocampo es una estructura que podría considerarse glutamatérgica debido a que sus células principales (piramidales) liberan glutamato. Sin embargo como ya lo hemos mencionado las interneuronas hipocámpales son GABAérgicas y como veremos recibe proyecciones de una gran cantidad de regiones cerebrales que lo proveen de diversos neurotransmisores. En la figura 2.10 puede observarse una esquematización de algunos de los transmisores más importantes que inervan el hipocampo, la noradrenalina, la dopamina, la serotonina y la acetilcolina.

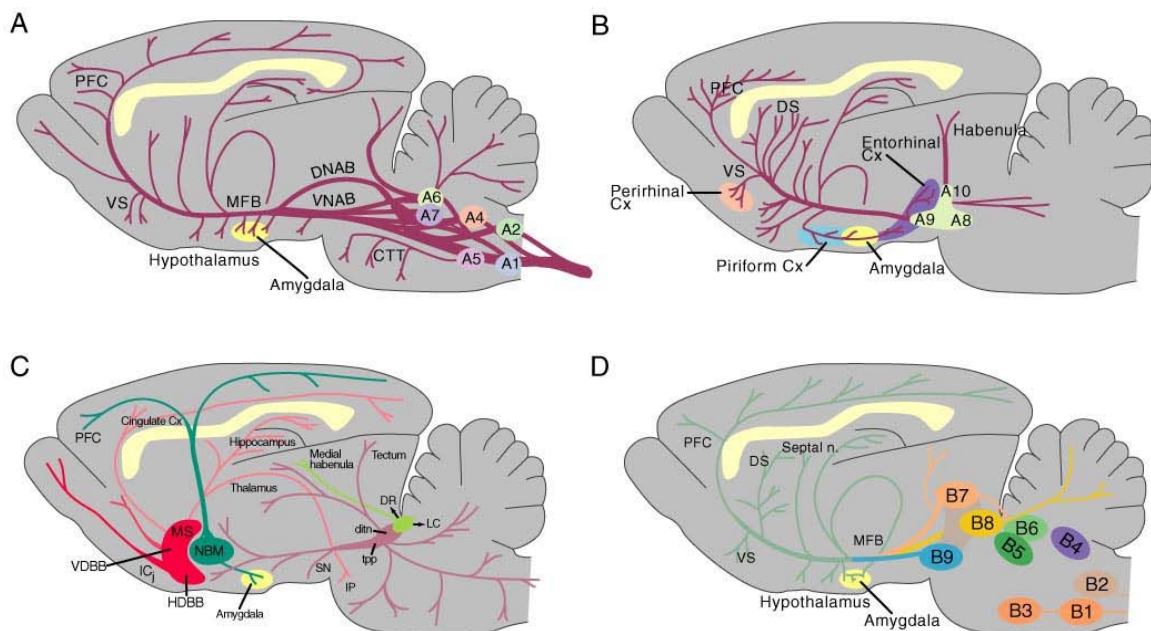


Figura 2.10 Muestra algunos de los de los sistemas de transmisión que inervan el hipocampo (enmarcado en un círculo rojo en todos los paneles). (A) Muestra los diferentes grupos celulares que producen la noradrenalina en el cerebro de rata (A1 a A7) el núcleo A6 es el Locus Coerúleo. (B) Muestra el sistema dopaminérgico (A8-A10). (C) Muestra el sistema colinérgico, obsérvese el septum medial (MS) que es la

estructura que proyecta la mayor cantidad de acetilcolina al hipocampo. (D) Representa el sistema serotoninérgico los núcleos del raphe van de B4 a B9.

La noradrenalina en el hipocampo proviene de varios grupos neuronales que se encuentran en el mesencéfalo y el puente entre los que destaca el Locus Coeruleus (Fig 2.10 a). *La dopamina* que llega al hipocampo proviene del área ventral tegmental (VTA) (Fig 2.10 b). Se ha mostrado que la dopamina puede afectar procesos plásticos en el hipocampo como la potenciación de largo plazo (LTP, se ha propuesto como una evidencia electrofisiológica de almacenamiento de memoria, se discute mas adelante en el apartado de potenciación de largo plazo) (para revisión Jay, 2003). *La serotonina* es otro de los neurotransmisores que inerva al hipocampo. Proviene de varios grupos neuronales en el mesencéfalo y en el puente, entre ellos se encuentran los núcleos del Raphe (Fig 2.10 d). *El sistema colinérgico* es uno de los sistemas más relacionados con la memoria y hasta el momento existen varias propuestas de su posible papel en los procesos anémicos (para revisión Hasselmo y McGaughy, 2004; Hasselmo, 2006). La acetilcolina que llega al hipocampo proviene casi en su totalidad del cerebro basal anterior, principalmente del septum a través de la fimbria fornix (Fig 2.10 c).

Plasticidad Sináptica en el Hipocampo

La plasticidad sináptica puede ser definida como un cambio estructural en el cerebro como resultado de la excitación de una neurona o de grupos neuronales. En este caso particular, nos referimos a un cambio estructural en la formación hipocampal dependiente de determinados tipos de actividad. Muchos investigadores se han adherido a la idea propuesta por Ramon y Cajal, quien argumentó que el almacenamiento de información en el cerebro es el resultado en el cambio en la estructura de las neuronas. Un punto teórico fundamental fue aportado por Donald Hebb (1949) quien propuso que el aprendizaje y la memoria estarían supeditados al fortalecimiento de la sinapsis, producido por el disparo coordinado de la célula pos y pre-sináptica. Mas adelante el descubrimiento fundamental que sustento la propuesta teórica de Hebb fue la “*Potenciación de Largo Plazo*” o LTP (por sus siglas en ingles “Long-Term

Potentiation”). Tim Bliss y Terje Lomo describieron la LTP por primera vez en 1973 (Bliss y Lomo 1973) trabajando en el hipocampo de conejos, específicamente en el giro dentado. En este estudio estos autores describieron que la estimulación breve de alta frecuencia en la vía perforante producía una respuesta facilitada de larga duración en las células del giro dentado. Posteriores estudios han mostrado que puede encontrarse LTP al estimular las fibras musgosas y registrar en las células de CA3. También al estimular las colaterales de Shaffer y registrar en las células CA1 (para revisión Lynch 2004). Otras regiones del cerebro también han mostrado la capacidad de presentar LTP, como el estriado (para revisión Calabresi y col, 2007), la corteza cerebral y la amígdala (para revisión Lynch, 2004).

En la figura 2.11 a y b puede observarse el protocolo mas utilizado para producir LTP en el hipocampo. De entre los mecanismos que se encuentran detrás de la LTP destaca la activación de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, que se han considerado como un evento indispensable en la mayoría de las LTP's descritas hasta el momento (para revisión Kullman et al, 2000; Lynch, 2004). Los NMDA's son ionóforos permeables a calcio, que se abren cuando el glutamato (proveniente de la presinápsis) esta unido a ellos y cuando la célula postsináptica esta despolarizada, esto convierte a la entrada de calcio en un evento dependiente de la coincidencia de la activación la región pre y postsináptica, justo como Hebb lo había predicho. Se ha observado que el bloqueo del calcio postsináptico mediante quelantes de calcio inhibe la LTP (Lynch y col, 1973). El incremento en las concentraciones de calcio intracelulares desencadena varias cascadas de segunda mensajería que concluyen la síntesis de nuevas proteínas. Como puede verse en la figura 2.11 D tomada de Lynch (2004) estas vías incluyen la PKA, PKC, CaMKII que confluyen en la proteína ERK quien producirá la activación de diferentes factores de la transcripción como el CREB, c-fos, c-jun entre otros. La síntesis de nuevas proteínas es otro aspecto fundamental en los procesos plásticos como la LTP ya que serán estas las que concluirán con un cambio estructural de la sinapsis permitiéndole una mayor eficiencia, fortaleciéndola, tal como lo había predicho Hebb en 1949. Estos cambios estructurales significan el crecimiento o surgimiento de nuevos botones sinápticos (Fig 2.11b), la síntesis

de nuevos receptores y proteínas estructurales (para revisión Lamprecht y LeDoux, 2004).

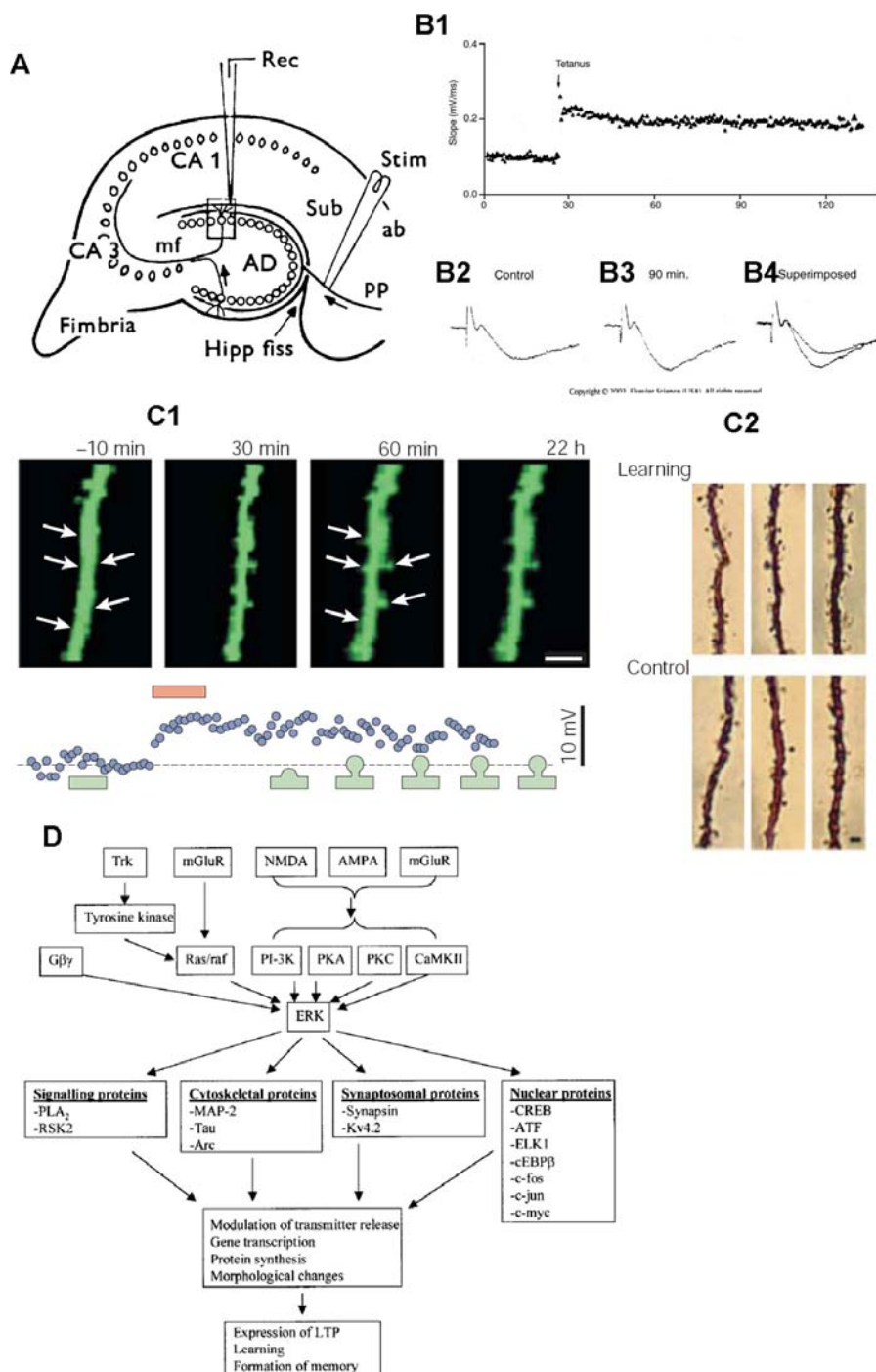


Figura 2.11 LTP y plasticidad sináptica en el hipocampo. (A) Tomada de Bliss y Lomo 1973, representa el lugar del hipocampo donde fue registrada la LTP por primera vez. El electrodo de estimulación (**stim**) fue colocado en la vía perforante (**pp**) proveniente de corteza entorrinal y el electrodo de registro (**rec**) fue colocado en la región del giro dentado (**AD**). (B) Tomada del libro Fundamental Neuroscience Blomm y col, 2006, muestra un registro típico de los potenciales postsinápticos excitadores en el hipocampo antes y después del estímulo de alta frecuencia (tetanus en B1) que produce la LTP. Obsérvese como después de la estimulación la respuesta se mantiene

facilitada hasta por 120 minutos. También se muestra un potencial postsináptico excitador en condiciones control (**B2**), 90 minutos después de la estimulación (**B3**) y un trazo donde se sobreponen con motivos didácticos (**B4**). (**C**) Tomado de **Lamprecht y Ledoux, 2004**, muestra los cambios estructurales que se producen en la sinapsis después de someterlas a un proceso de LTP (**C1**) o de aprendizaje (**C2**). En **C1** las flechas indican los botones que crecen en las espinas dendríticas después de varias horas de LTP, en **C2** se observa este mismo tipo de cambios antes y después de una tarea espacial que requiere la participación del hipocampo. (**D**) Tomado de **Lynch, 2004**, esquematiza las diferentes cascadas de segunda mensajería involucradas en la LTP, desde la activación de los receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA y mGLUR, pasando por la expresión de proteínas y hasta la expresión de LTP. Obsérvese como todos los procesos confluyen en la proteína ERK que será quien inicie los procesos para la transcripción.

Complementariamente a la LTP existe la depresión de largo plazo o LTD por sus siglas en inglés (Long-Term Depression), que al contrario de la LTP representa una disminución en la respuesta sináptica después de un protocolo de estimulación específico (para revisión, Kemp y Bashir, 2001; Malenka y Bear, 2004). LTD será discutido en la sección de plasticidad sináptica del estriado.

2.3 El Núcleo Estriado

El núcleo estriado forma parte de un conjunto de núcleos denominados núcleos basales o ganglios de la base. Estos se encuentran implicados en funciones motoras, cognitivas y de aprendizaje y memoria. Como puede observarse en la figura 2.12 los núcleos basales son, el **Núcleo Estriado (EST)** que puede ser dividido en caudado y putamen, el **Globo Pálido**, que está dividido en el globo pálido interno (**GPI**) y externo (**GPe**), el GPI también es conocido como el núcleo entopeduncular. El **Núcleo Subtalámico (STN)** y la Sustancia Negra que está dividida en la sustancia negra pars compacta (**SNc**) y pars reticulata (**SNr**). En este proyecto me enfoqué en el núcleo estriado por su relación con los procesos mnemónicos. El EST representa la mayor entrada de información hacia los núcleos de la base, prácticamente toda la corteza proyecta de forma topográfica hacia él. Los núcleos de salida de los núcleos de la base son el GPI y la SN. Estos núcleos proyectan primero hacia el tálamo ventral y de ahí hacia la corteza o hacia áreas subcorticales como la formación reticular o los colículos superiores.

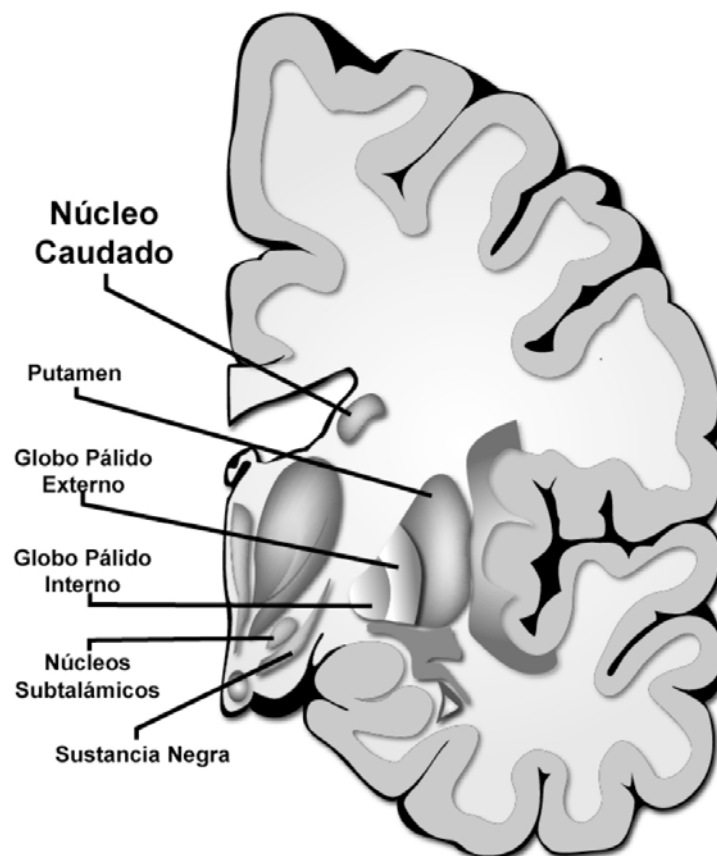


Figura 2.12 Núcleos de la Base en corte coronal de cerebro humano. Puede observarse al núcleo caudado, al putamen, el globo pálido interno y externo, los núcleos subtalámicos y la sustancia negra. (Tomado de Rueda-Orozco et al, 2006).

Es bien aceptada la existencia de dos vías a través de las cuales la información que proviene desde la corteza cerebral fluye a través de los núcleos basales, la vía directa y la vía indirecta (para revisión, Albin y col, 1989; Bolan y col, 2000). La vía directa inicia con la proyección desde la corteza cerebral hacia el estriado donde se proyecta directamente hacia los núcleos de salida como el GPi. (Fig 2.13). Por su parte la indirecta conlleva otras conexiones entre el estriado y el GPi. Aquí la información que llega al EST pasa después al GPe de ahí al STN para después pasar al tálamo ventromedial y finalmente regresar a la corteza (Fig 2.13). Como puede observarse en la figura 2.13 la mayoría de las conexiones intra-basales son de naturaleza GABAérgica con excepción del STN que es glutamatérgico. De esta forma la activación de la vía directa resultará en una activación del tálamo mediante la inhibición de las células GABAérgicas del GPi y como resultado la activación de la corteza cerebral. Por su parte la activación de la vía indirecta resultará en la

inhibición del tálamo mediante la activación de las células GABAérgicas del GPI y por lo tanto inhibición de la corteza cerebral.

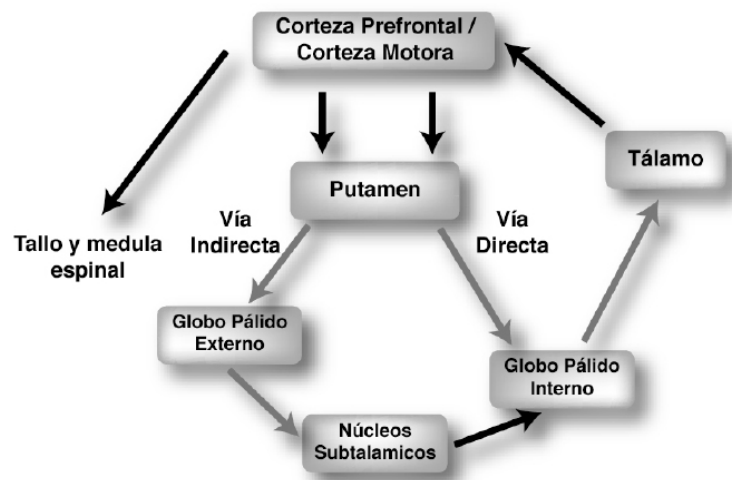


Figura 2.13 Vía directa e indirecta en los núcleos de la base. Las flechas oscuras representan las conexiones excitadoras (glutamato) mientras que las flechas claras representan las conexiones inhibitorias (GABA).

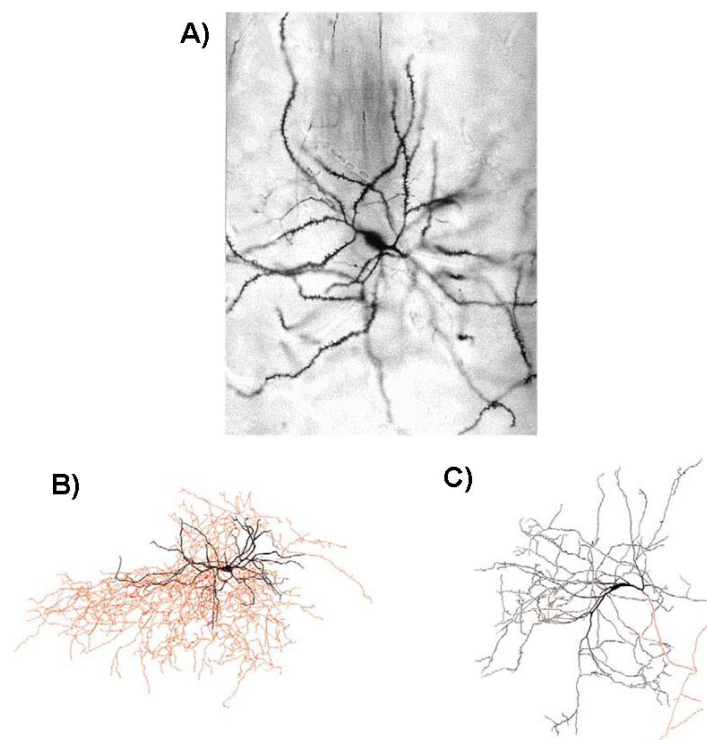


Figura 2.14 (a) Neurona Espino Mediana Estriatal. Micrografía de Luz teñida mediante la técnica de Golgi tomada de Bolam y col, 2000. Interneuronas GABAérgicas (b) y colinérgicas (c) en los núcleos de la base.

Con respecto a las poblaciones neuronales, el estriado contiene neuronas de proyección conocidas como las “neuronas espinosas medianas” (nem’s) y varias poblaciones de interneuronas. Las nem’s (fig 2.14) son las células principales del estriado, son de naturaleza GABAérgica y constituyen entre el 90-95% del total de neuronas del estriado. Estas son las células que reciben la inervación de la corteza cerebral.

Las nem’s se dividen a su vez en dos sub-poblaciones de acuerdo a sus características anatómicas y neuroquímicas. Las que se encuentran en la vía directa que proyectan directamente desde el estriado al GPi y que además de expresar GABA también expresan los neuropéptidos Sustancia P y Dinorfina. Estas células expresan a su vez el receptor dopaminérgico D1 (excitador). La segunda subpoblación es la que lleva la información a la vía indirecta. Estas células expresan los péptidos encefalinas y el receptor D2 (inhibidor). También se ha mostrado que además de proyectar a la vía directa e indirecta las nem’s tienen extensos axones colaterales que las comunican con otras nem’s en el mismo estriado.

Además de las nem’s, en el estriado también podemos encontrar interneuronas, entre las que destacan las interneuronas GABAérgicas (Fig 2.14 B) y las colinérgicas (Fig 2.14 C) (Para revisión Tepper y Bolam, 2004). Las interneuronas GABAérgicas pueden dividirse en tres tipos desde el punto de vista neuroquímico, las que son inmunoreactivas para parvalbumina, las inmunoreactivas para calretinina y las reactivas para somatostatina y neuropeptido Y. Por otro lado, las interneuronas colinérgicas (las neuronas más grandes en el estriado y representan tan solo el 0.3% del total de neuronas estriatales) disparan a frecuencias muy bajas. Se ha demostrado que estas células son capaces de disparar ante la presencia de un reforzador y en tareas operantes (Kimura y col, 1984). Por otro lado también se ha demostrado que la pérdida selectiva de neuronas colinérgicas estriatales da como resultado un desbalance en la transmisión dopaminérgica y un severo deterioro de la función motora, caracterizado por el giro incontrolable hacia el lado opuesto del estriado sin células colinérgicas (Kaneko y col, 2000).

Como podemos ver, la neurotransmisión en los núcleos de la base es muy variada; sin embargo, podemos distinguir tres clases principales de neurotransmisión, los neurotransmisores clásicos representados por el glutamato y el GABA, el primero liberado principalmente desde la corteza cerebral, el tálamo y los núcleos subtalámicos, el GABA representado por las nem's y las interneuronas GABAérgicas. Por otro lado están los neurotransmisores moduladores, como la dopamina, que proviene principalmente de la sustancia negra y el área ventral tegmental y la serotonina que proviene de los núcleos del raphe en el puente. Los neuropéptidos que se encargan de la transmisión lenta y de facilitar o inhibir los efectos de los otros neurotransmisores, son coliberados generalmente con el GABA. (Para una revisión de los distintos sistemas de transmisión en el estriado vea Graybiel, 1992; Di Chiara y col, 1994) En la figura 2.15 se pueden observar los diferentes neurotransmisores antes mencionados.

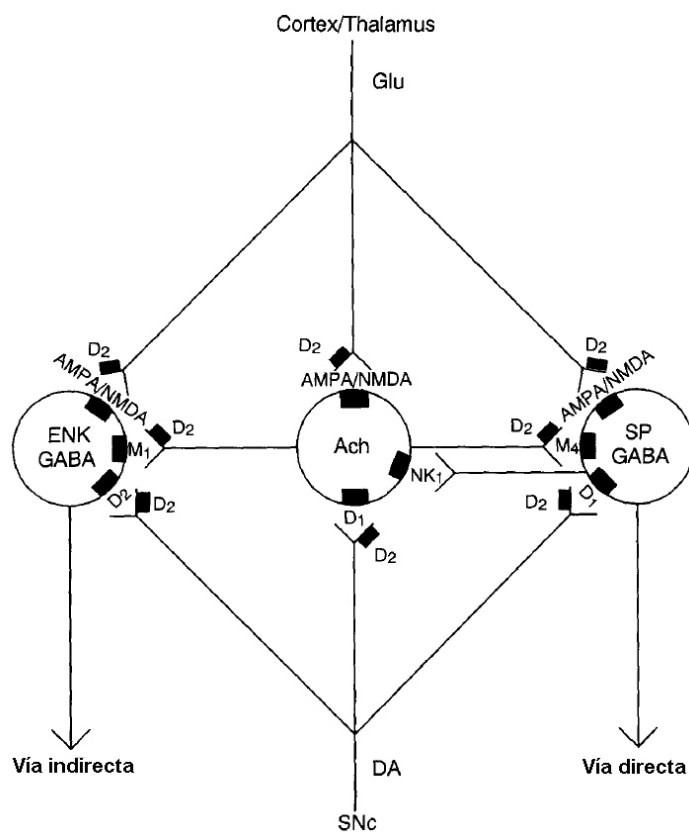


Figura 2.15 Neurotransmisores en el estriado. Esquema tomado de Di Chiara y col, 1994. Se muestran los principales sistemas de transmisión en el estriado, las células principales (nem's) son GABAérgicas y van hacia la vía directa o indirecta. Se representa al centro una ínterneurona colinérgica (**ACh**) que inerva a ambas neuronas de proyección, las células de la vía directa expresan el receptor colinérgico muscarínico **M4** mientras que en la vía indirecta expresan

el **M1**. Se representa también la entrada glutamatérgica (**Glu**) proveniente de la corteza y el tálamo (**Cortex/Thalamus**), que inerva tanto a células de proyección como interneuronas a través de sus diferentes receptores como el AMPA y el NMDA. La inervación dopaminérgica (**DA**) proveniente de la sustancia negra pars compacta (**Snc**) también inerva a interneuronas y neuronas de proyección, en la vía directa. Estas expresan el receptor D1 mientras que en la indirecta se expresa el D2, ambos a nivel postsináptico. Todas las regiones presinápticas se muestran expresando el D2.

Plasticidad Sináptica en el Estriado

La plasticidad sináptica en el estriado al igual que en el hipocampo esta principalmente representada por el mecanismo de LTP y LTD (para revisión Calabresi y col, 2007). Existen, sin embargo, algunas diferencias, por ejemplo, la LTP en el estriado ha sido demostrada como dependiente de los receptores D2 de dopamina y no de los NMDA como en el caso del hipocampo (Clabresi y col, 1992; Charpier y Deniau, 1997). Los primeros reportes de LTD en el estriado se dieron en la década de los 90's cuando se demostró que la estimulación de alta frecuencia producía LTD en el estriado (Calabresi y col, 1992; Lovinger y col, 1993; Walsh, 1993). En uno de estos experimentos se indujo LTD mediante la estimulación de las fibras provenientes de la corteza cerebral (glutamatérgicas), se concluyó que la LTD en el estriado, al igual que la LTP, es independiente de los receptores AMPA y NMDA; pero la activación de receptores metabotrópicos glutamatérgicos así como los D1 y D2 dopaminérgicos era indispensable. También se concluyó que se requería de la activación de las células postsinápticas y aparentemente una disminución en la liberación de glutamato proveniente de la corteza. Mas adelante se demostró que otro requerimiento indispensable para el establecimiento de LTD estriatal es la liberación de canabinoides endógenos desde la postsinápsis y presencia del receptor a canabinoides en la presinápsis (Gerdeman y col, 2002; Ronesi y Lovinger, 2005). Esto se discutirá en la sección de canabinoides en el estriado. Últimamente se ha puesto énfasis en el estudio de la síntesis de proteínas en este proceso y al parecer se requiere de síntesis de nuevas proteínas en la región presináptica para poder mantener la LTD (Yin y col, 2006). Es por estas razones que se ha propuesto que la LTD, en el estriado, es un mecanismo que requiere de la actividad de la postsinápsis, pero que se expresa en la presinápsis en la forma de disminución de la liberación de glutamato. En la

figura 2.16 se muestra la representación gráfica de la LTD en el hipocampo y en el estriado. Como se observa, la LTD hipocampal es producida mediante estimulación de baja frecuencia (Fig 2.16 A, 3Hz). Con forme la frecuencia de estimulación aumenta, la LTD se va perdiendo hasta transformarse en LTP, por el contrario, en el estriado LTD es producida mediante trenes de estimulación de alta frecuencia (Fig 2.16 D).

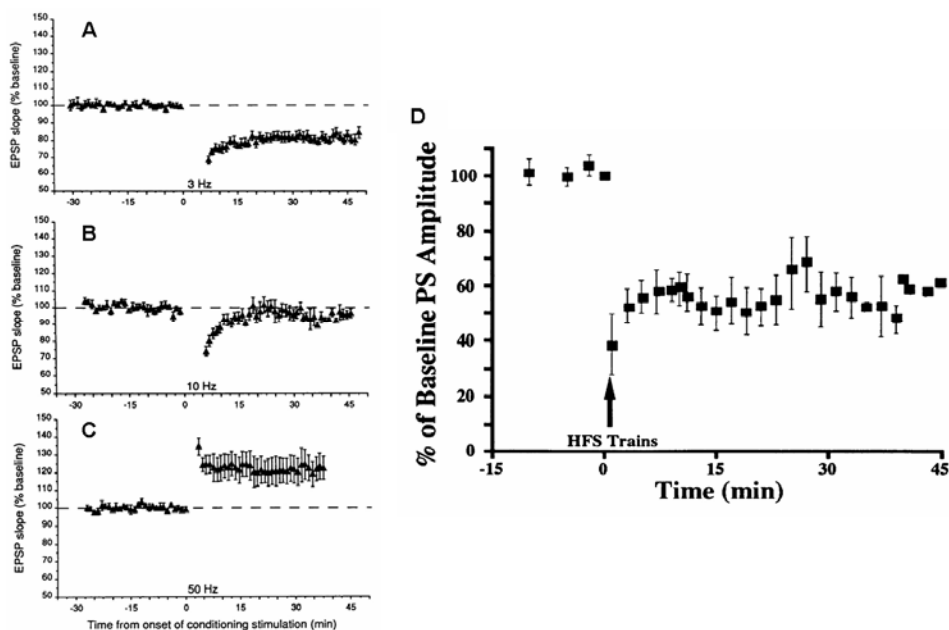


Figura 2.16 LTD en el hipocampo y el estriado, A, B y C Tomadas de **Bear, 1996**. (A) Estimulación de baja frecuencia en el hipocampo (3Hz) produce una disminución en la respuesta. La línea base se encuentra antes del cero en el eje de las abscisas (escala de tiempo). (B) La estimulación de mediana frecuencia (10Hz) produce una ligera LTD de bajo voltaje que no se mantiene. (C) La estimulación de alta frecuencia (50Hz) produce LTP. (D) Tomado de **Lovinger, 1993**. En el estriado la estimulación de alta frecuencia (100Hz) produce LTD, la flecha indica el momento donde se aplicó la estimulación.

La funcionalidad de la LTD en el estriado ha comenzado a estudiarse en la conducta recientemente. En un artículo Kreitzer y Malenka (2007) muestran que en ratones en los que se ha practicado un modelo de enfermedad de parkinson (caracterizado por la destrucción de la innervación dopaminérgica al estriado) la LTD no está presente. Sin embargo, al recuperar esta LTD mediante la combinación de fármacos dopaminérgicos y cannabinérgicos, los ratones muestran importantes mejorías, como la recuperación del movimiento y la disminución de temblores.

2.4 Conclusiones en los sistemas de memoria

Hasta ahora hemos revisado información concerniente a dos sistemas de memoria, el sistema hipocampal y el sistema estriatal. Hemos reconocido sus diferencias estructurales y su papel en la memoria.

A continuación enlisto algunas conclusiones de lo revisado en este capítulo:

- Al incorporarse a la memoria la información sigue un curso temporal en el que podemos distinguir a la memoria de corto y largo plazo.
- Existe un periodo de labilidad en el que la información es susceptible de ser olvidada. Después de superar con éxito este periodo la información es consolidada en el almacén de largo plazo. Por lo anterior es posible reconocer e intervenir experimentalmente en las diferentes fases de la memoria, como en la adquisición, la consolidación y la evocación de la memoria.
- Existen diferentes tipos de información que son codificados y almacenados de manera diferencial en el cerebro, de aquí se desprende la clasificación clásica que divide a la memoria en declarativa y no declarativa
- De acuerdo a la literatura podemos distinguir diferentes estructuras cerebrales que pueden considerarse como representantes de los diferentes sistemas de memoria. De particular importancia para este proyecto es el hipocampo, como representante de la memoria declarativa y el estriado como representante de un tipo de memoria no declarativa.
- En ambas estructuras se han podido observar importantes indicadores de plasticidad sináptica; la cual, ha sido propuesta como el sustento del almacenamiento de la información y para que esta ocurra se requieren de distintos eventos moleculares y de la participación de distintos neurotransmisores.

En el siguiente capítulo revisaremos lo concerniente a un sistema de transmisión conocido como endocannabinérgico y que potencialmente esta relacionado con los procesos de memoria.

3. El sistema canabinérgico

3.1 Introducción al sistema canabinérgico

El sistema canabinérgico tiene ese nombre por causa del principal componente activo de la marihuana, el Δ -9 Tetrahidrocanabinol (Δ -9 THC o THC) quien es responsable de los principales efectos del su consumo de marihuana (para revisión Ranganathan y D'Souza, 2006; Costa, 2007). El THC fue por primera vez aislado de la *Cannabis sativa* en 1942, y más tarde su estructura fue elucidada por el grupo de Raphael Mechoulam en 1964 (Gaoni y Mechoulam, 1964), a partir de entonces muchos estudios se realizaron en busca del lugar en el cerebro a través del cual el THC ejercía sus efectos. En 1988 Devane y col., utilizando el canabinoide de diseño, el CP55,940, descubren el receptor a canabinoides y este fue llamado receptor a canabinoides 1 o CB1. Posteriormente en 1992 se describió el primer ligando endógeno con afinidad por el CB1 este fue llamado anandamida. Actualmente se han descrito al menos cinco componentes más con características similares y se ha acordado llamar a estos compuestos canabinoides endógenos o endocanabinoides. Juntos, los receptores a canabinoides, los endocanabinoides y algunas enzimas responsables de la degradación y recaptura de los endocanabinoides forman lo que ahora se conoce como el sistema canabinérgico.

En este trabajo enfocado principalmente en el sistema canabinérgico por lo que se dedicará muy poco a la interesante discusión de la marihuana. En el presente capítulo retomaremos en detalle la literatura actual con respecto a las principales características y mecanismos funcionales del sistema canabinérgico, trataré además de enfocarme en lo posible a los estudios donde se relaciona al sistema canabinérgico con el hipocampo, el núcleo estriado y la memoria.

3.2 El Receptor a Canabinoides 1

El CB1 es una proteína que fue clonada por primera vez en 1990 por Matsuda y col., sin embargo, se sospechaba de su existencia desde 1984 cuando el Howlet y Fleming (1984) demostraron que la administración de THC causaba la inhibición funcional de la adenilato ciclasa en células de neuroblastoma. Esta inhibición fue bloqueada por PTX lo cual sugería que se trataba de una proteína $G_{i/o}$ (Howlet y col, 1986).

El CB1 es un receptor metabotrópico de siete dominios transmembranales acoplado a una proteína $G_{i/o}$, que modula negativamente a la adenilato ciclasa y a positivamente a los canales rectificantes de potasio. (Figura 3.1).



Figura 3.1 Representación del receptor metabotrópico para canabinoides uno (CB1). Tomado de Nie y Lewis, 2001.

Se encuentra altamente distribuido en prácticamente todo el sistema nervioso central; sin embargo, hay estructuras que presentan una mayor concentración (Glass y col, 1997; Tsuo y col, 1998). Entre las estructuras más sobresalientes están el cerebelo, el hipocampo, los núcleos de la base (el globo pálido, la sustancia negra y el estriado dorsal son las regiones que mas expresan el receptor), la corteza cerebral, el cerebelo (Glass y col, 1997; Tsuo y col, 1998). Estas estructuras están implicadas procesos como el control motor, el aprendizaje y la memoria.

En el presente apartado revisaré las características más fundamentales del CB1 en el contexto de la modulación de los sistemas de memoria.

1. Localización del CB1

El receptor a canabinoides se encuentra prácticamente en todo el sistema nervioso central en el humano y en la rata (Glass y col, 1997; Tsou y col, 1998; Petit y col, 1998; Egertova y Elphick, 2000). Todos los estudios realizados hasta el momento demuestran que las mas altas concentraciones del CB1 (proteína y ARNm) en el cerebro se encuentran en la sustancia negra, el cerebelo, el hipocampo, los núcleos de la base y la corteza cerebral (Glass y col, 1997; Tsou y col, 1998; Petit y col, 1998; Egertova y Elphick, 2000), concentraciones moderadas pueden encontrarse en la amígdala, el tálamo y el hipotálamo, (Fig 3.2). Para efectos de este trabajo nos enfocaremos en el hipocampo y en el núcleo estriado. La mayoría de los estudios muestran que la región presináptica es la más rica en el receptor (Ong y Marie, 1999; Hoffman y col, 2003; Kófalvi y col, 2005) sin que esto quiera decir que no pueda encontrarse en la postsinapsis.

2. Acoplamiento a Proteínas G

Como había mencionado el CB1 es un receptor metabotrópico acoplado a una proteína G. El CB1 esta constituido por 7 dominios transmembranales, Nie y Lewis (2001) mostraron que el dominio intracelular C-terminal (aminoácidos 401 a 417) es básico para el pegado a la proteína G (Fig. 3.1). Se ha demostrado también que los efectos de la activación del CB1 pueden bloquearse en presencia de PTX (picro-toxina-X), sugiriendo que estos están unidos a proteínas $G_{i/o}$ (para revisión, Axelrod y Felder, 1998; Demuth y Molleman, 2006). Recientemente Jarrahian y col. (2004) han mostrado evidencia de que el CB1 puede estar acoplado en ciertas condiciones a proteínas G_s . Este estudio así como algunos previos (Glass y Felder, 1997) sugieren una forma alternativa por la que el CB1 podría modular la actividad sináptica. Sin embargo la evidencia más contundente hasta el momento es la de la asociación del CB1 con proteínas $G_{i/o}$.

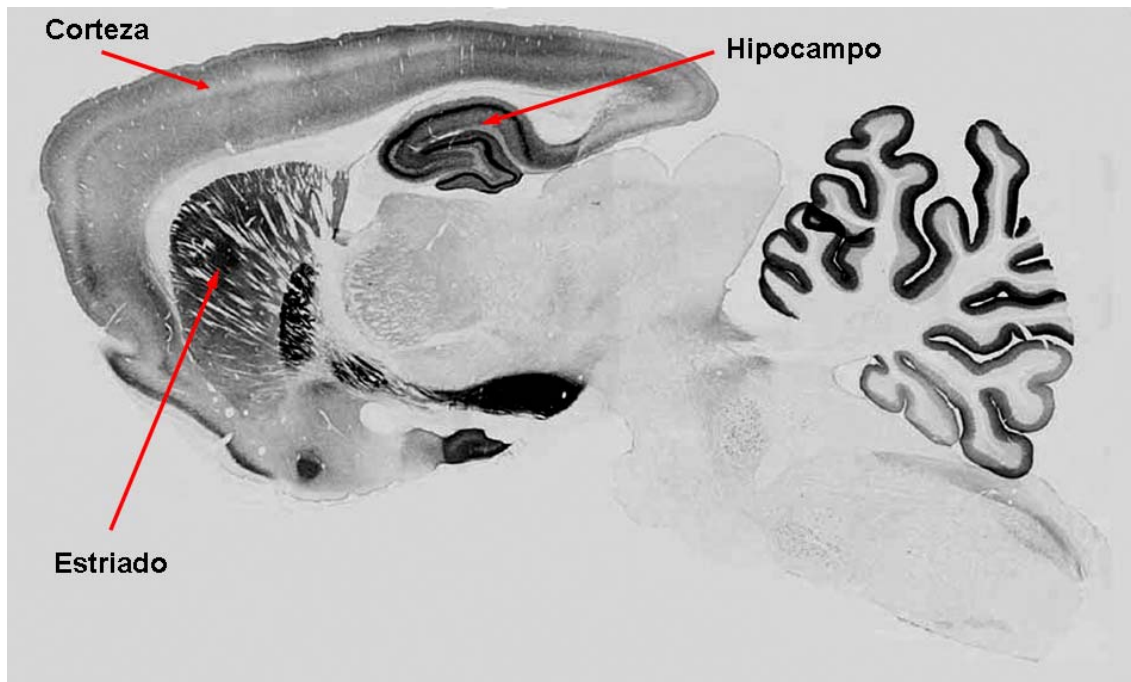


Figura 3.2 Inmunohistoquímica contra CB1 en cerebro de rata (Cortesía de Martínez-Vargas M). Puede observarse la gran reactividad en regiones como el cerebelo y la sustancia negra. Se señalan el hipocampo y el estriado por su gran reactividad y por su relevancia en procesos mnemicos y para este trabajo en particular.

3. Regulación de Adenilato ciclasa

El primer efecto observado por la activación de los receptores canabinoides fue la inhibición de adenilato ciclasa en células de neuroblastoma, en 1984 por el Howlet y Fleming. Después de este reporte siguieron otros mostrando que los mismos efectos podían obtenerse en tejido cerebral de rata (Childers y col, 1994; Bidat-Russell y col, 1990; Wade y col, 2004). El principal resultado de la inhibición de la adenilato ciclasa es una disminución en la concentración de AMP cíclico (AMPC). Este segundo mensajero es fundamental en procesos de memoria y aprendizaje. En la figura 3.3 muestro una caricatura de los principales efectos de la activación del CB1.

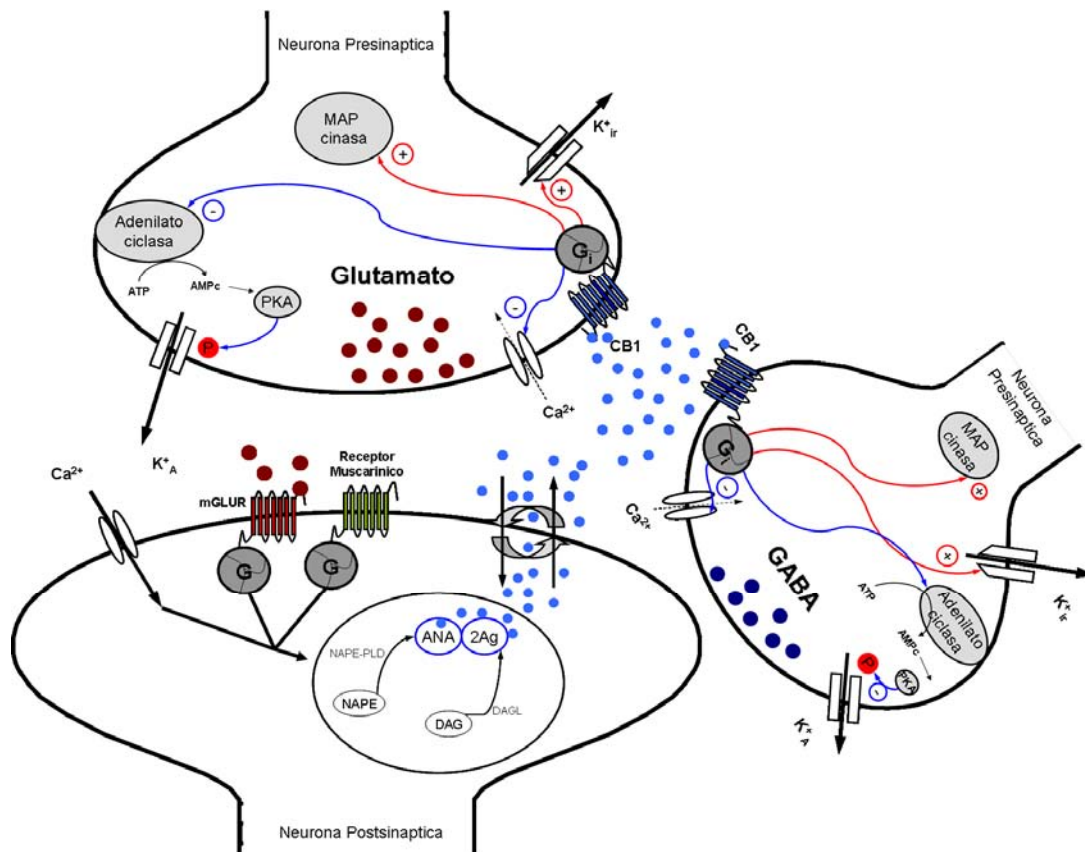


Figura 3.3 Modelo de la presencia y activación presináptica del CB1 en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas. Se ha propuesto que la activación del CB1 en ambos tipos de células potencialmente desencadenaría los mismos tipos de segunda mensajería. A nivel postsináptico la liberación de cannabinoides endógenos es dependiente del aumento en las concentraciones de calcio intracelular.

3.3 *Canabinoides Endógenos*

1. Generalidades Moleculares

Los cannabinoides endógenos o endocannabinoides son las moléculas producidas por algunas células, entre ellas las neuronas y que se unen a los receptores a cannabinoides. La primera molécula descrita como endocanabinoide fue la “araquidoniletanolamida” o *anandamida* (ANA) (Devane y col, 1992). Mas adelante se describió el “2-araquidonilglicerol” o 2-AG (2AG) (Mechoulam y col 1994), la “*cis*-9-10-oactadecenoamide” o oleamida (OLE) (Lerner y col, 1994), y mas recientemente se han descrito el “2-araquidonilglicerol ether” o noladin (2AGE) (Hanus y col, 2001); la “O-

araquidnil-etanolamina” o virodamina (OAE) (Porter y col, 2002); y la “*N-araquidonil-dopamina*” (NADA) (Bisogno y col, 2000; Huang y col, 2002). Todas estas moléculas tienen la característica de ser lípidos y pueden observarse en la figura 3.4. De esta familia el endocanabinoide más estudiado es ANA y después el 2AG. Lo que ha podido observarse en el caso de ANA y 2AG es que a diferencia de otros transmisores estos no se almacenan en células en reposo, sino que son sintetizados y liberados a demanda cuando las células son activadas en condiciones de activación fisiológica o patológica (para revisión Alger 2002).

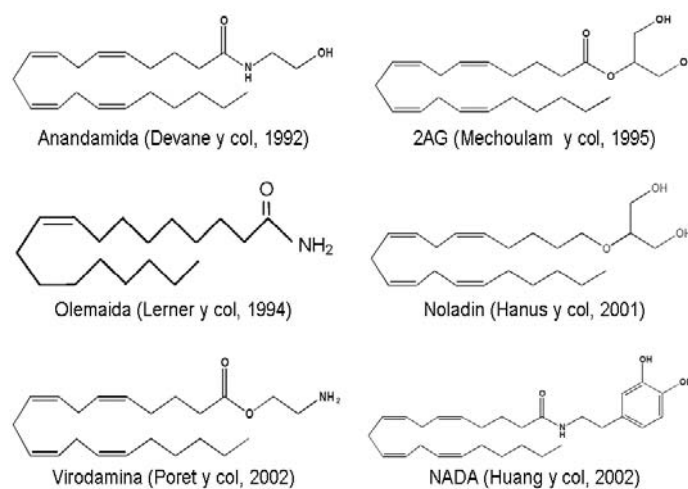


Figura 3.4 Se muestra la estructura química de los endocannabinoides descritos hasta el momento. Anandamida y 2AG son los más estudiados hasta la fecha.

Con respecto a los otros endocannabinoides, hasta el momento no existe evidencia que sugiera los mecanismos o las condiciones en las que se producen y se liberan. En este trabajo hemos decidido trabajar con anandamida, por las ventajas que significa tener una mayor cantidad de información al respecto de su síntesis, liberación y degradación. A continuación describiré los mecanismos propuestos de síntesis y degradación para este endocanabinoide.

2. Anandamida

Síntesis: La anandamida fue descrita en 1992 (Devane y col, 1992). Pertenece a una familia conocida como N-acyl-ethanolaminas (N-AEs). Se ha llegado a la conclusión de que ANA proviene de la hidrólisis enzimática de N-

acil-fosfatidiletanolamina (NAPE) (Hansen et al, 1995, 1998). La enzima responsable de la transformación de NAPE en anandamida es la Fosfolipasa D selectiva para la NAPE (NAPE-PLD) (Dimarzo y col, 1994) que fue clonada hace mas de 10 años (Okamoto y col, 1994), esta encima parece clave en el proceso de síntesis de anandamida y se ha demostrado que su activación es dependiente de calcio. La presencia de NAPE es debida a la acción de la N-acetiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo acilo de la fosfatidilcolina a la molécula de fosfatidiletanolamina (Cadas y col, 1996). Este proceso esta facilitado en presencia de calcio y AMPc. La figura 3.5 muestra el proceso de síntesis de anandamida. A pesar de que esta vía es la mas aceptada para la síntesis de anandamida (para revisión Bisogno y col, 2005; Rodríguez de Fonseca y col, 2005) también se ha propuesto un mecanismo alternativo independiente de la NAPE-PLD (Sun y col, 2004). Sin embargo, no se ha propuesto aun bajo que condiciones podría ocurrir.

Degradación. La degradación de anandamida ocurre a través de la hidrolasa para los ácidos grasos amidados o **FAAH** por sus siglas en inglés. Esta proteína fue descrita como una enzima que degrada los ácidos grasos amidados incluida anandamida y oleamida (Cravatt y col, 1996). Mas adelante se describió que la FAAH también degrada al 2AG (Goparaju y col, 1998) aunque con menor afinidad. Esta proteína se encuentra acoplada a la membrana celular en su cara intracelular y se ha podido localizar en los cuerpos celulares y dendritas de células principales del hipocampo, corteza cerebral, núcleo estriado y cerebelo (Egertova y col, 1998). Sus más altas concentraciones en el cerebro de ratón y rata se han encontrado en el hipocampo la corteza cerebral, el cerebelo y el núcleo estriado (Egertova y col, 1998, 2003). Otro dato de interés es que su distribución es complementaria a la del CB1 como puede observarse en la figura 3.6 tomada del trabajo de Egertova y col (2003), en donde podemos observar la distribución de la FAHH y el CB1 en el hipocampo y en el núcleo estriado en el cerebro de ratón. La ausencia de la FAAH en ratones modificados genéticamente, a dado como resultado niveles elevados de anandamida e hipersensibilidad a las administraciones de agonistas cannabinérgicos (Cravatt et al, 2001). Los mismos efectos se han observado al administrar un inhibidor farmacológico del

potencial transportador de ANA, el AM404 (Giuffrida y col, 2000). Con lo anterior se confirma su papel como modulador de la actividad del sistema canabínrgico. Este tipo de ratones sin FAAH son también distintos en su ejecución en pruebas conductuales como se verá mas adelante en el texto.

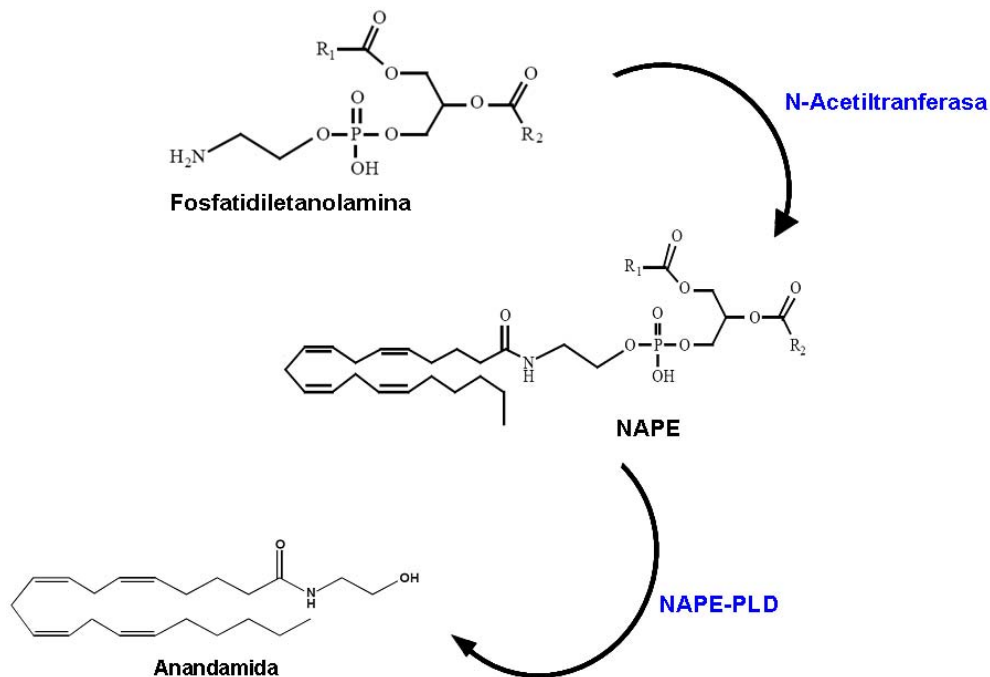


Figura 3.5 Se muestra la vía de síntesis mas aceptada para anadamida, las encimas en las que se ha puesto mayor atención son la N-Acetiltransferasa y la NAPE-PLD.

Uno de los puntos de mayor controversia en cuanto al sistema canabínrgico es la presencia de un transportador de tipo proteico para la liberación y recaptura de los canabinoides endógenos. El principal problema con el transportador es que aún no ha podido ser secuenciado ni clonado (para revisión Glaser y col, 2005), sin embargo existen evidencias que sugieren su existencia. El transporte de anandamida reúne cuatro criterios clave para pensar que es un proceso mediado por transportador: Saturabilidad, transporte rápido, dependencia de temperatura y selectividad de sustrato (Hillard y col, 1997; Beltramo y col, 1997; para revisión Glaser y col, 2005).

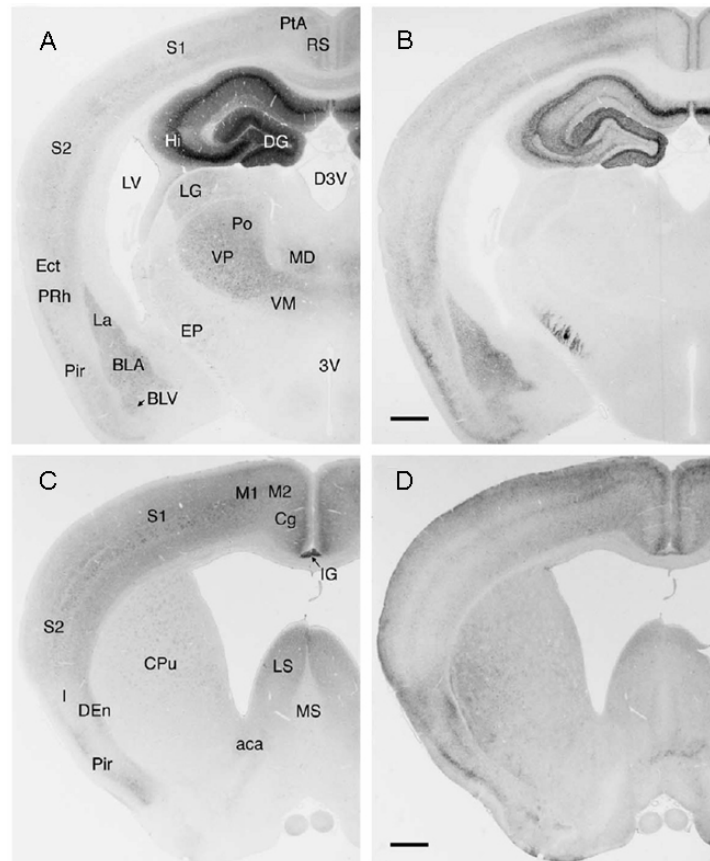


Figura 3.6 Inmunohistoquímica para la FAAH (A,C) y para el CB1 (B,D). (Tomado de Egertova y col, 2003). La expresión de ambas proteínas ocurre en los mismos sitios, en A B puede observarse el hipocampo con elevadas concentraciones de FAAH (A) y CB1 (B) y en C y D puede observarse el estriado dorsolateral, en este caso las concentraciones no son tan elevadas como en el hipocampo.

3.4 El sistema canabinérgico en el Hipocampo

Como hemos mencionado en el capítulo 2 por sus características anatómicas, el hipocampo ha sido dividido en subregiones, el giro dentado, CA4 o hilus, CA3, CA2, CA1 y el Subiculum. La expresión del CB1 en giro dentado es más alta en la capa molecular (Fig. 3.7 A, D). Por su parte en las regiones de CA1 y CA3, se ha mostrado una intensa inmunoreactividad en el Stratum Pyramidale (Figura 3.7 A, B, C). La inmunoreactividad observada en esta área se debe principalmente a fibras que rodean a los cuerpos de las células piramidales, que generalmente son inmunonegativos (Tsuo et al, 1998). A la fecha existe evidencia sólida que sustenta la presencia del CB1 en las presinápsis glutamatérgicas (Katona et al 2006; Sullivan, 1999) y GABAérgicas

(Katona et al 2000). Por otro lado, no existe evidencia de la presencia del CB1 a nivel postsináptico en el hipocampo.

*1. El Sistema canabinérgico, Transmisión Glutamatérgica
Hipocampal*

Se ha demostrado que la transmisión glutamatérgica se ve disminuida en presencia de agonistas al CB1 tanto en cultivos de células glutamatérgicas hipocampales (Sullivan, 1999) como en rebanadas (Kawamura y col, 2006). En estos estudios también pudo demostrarse que estos efectos eran mediados presinápticamente y que la respuesta evocada era de la misma magnitud, lo que disminuía era la frecuencia de la respuesta. Estos resultados sugieren que los efectos de los endocannabinoides sobre la transmisión glutamatérgica hipocampal son a través de la modulación de la liberación de glutamato y no por ejemplo, de antagonizar a los receptores de glutamato o inhibir la síntesis de este neurotransmisor. Consistente con lo anterior, Kawamura y col (2006), muestran histológicamente que el CB1 se encuentra en las terminales excitadoras glutamatérgicas.

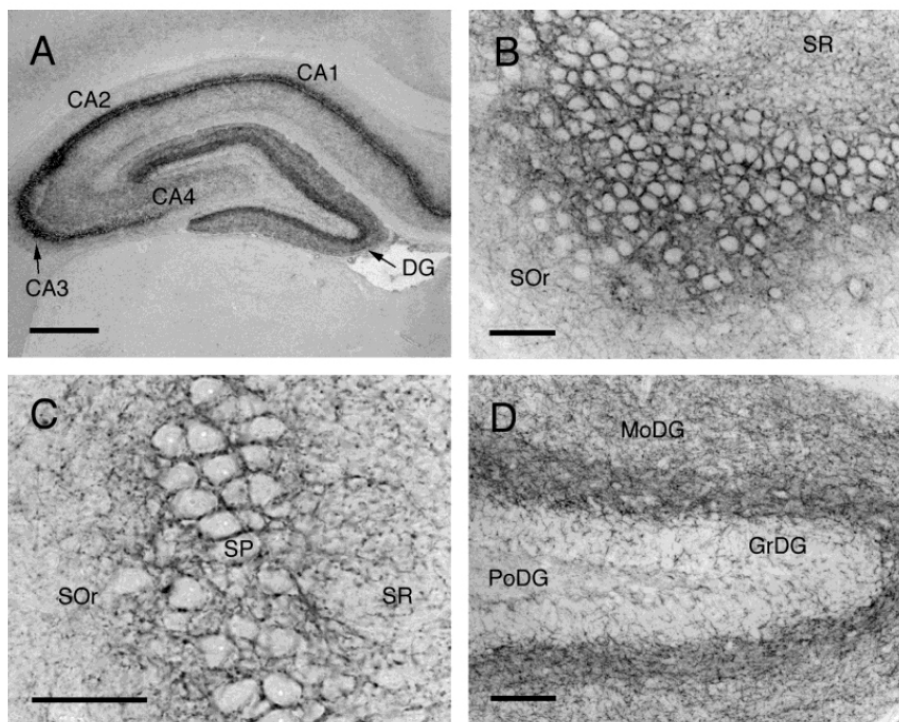


Figura 3.7 Inmunoreactividad al CB1 en la formación hipocámpal (tomado de Egertova y Elphick, 2000). **(A)** Se observan las distintas regiones del hipocampo (véase el texto), obsérvese la intensa

reactividad en las principales regiones hipocámpales. **(B, C)** Magnificación de la región CA3 del Hipocampo mostrando que la inmunoreactividad se encuentra concentrada alrededor de los cuerpos celulares que no muestran reactividad en el "stratum pyramidale" (SP). La inmunoreactividad está reducida en el stratum oriens (SOR) y el stratum radiale (SR). **(D)** En el giro dentado la inmunoreactividad se concentra en las fibras entre la capa molecular (MoDG), la capa granular (GrDG) así como la capa polimórfica (PoDG) no muestran tinción. Barras de referencia= 500 μm en A; 50 μm en B-D.

En un estudio utilizando ratones mutantes a los que les faltaba el CB1 específicamente en neuronas principales, pero no en interneuronas GABAérgicas, Domenici y col. (2006), comprobaron que la transmisión glutamatérgica en el hipocampo, la corteza visual y la amígdala es modulada directamente por el CB1 que se expresa en las terminales presinápticas originados por las células glutamatérgicas. En otro experimento, Takahashi y Castillo (2006) confirman las evidencias antes mencionadas (Sullivan, 1999; Domenici y col, 2006; Kawamura, 2006), en este estudio se trabajó con las fibras colaterales de Shaffer en la región CA1 hipocámpal en ratones Knockout para CB1 y ratones normales. Los resultados mostraron que los ratones normales mostraron una enorme disminución en la transmisión glutamatérgica en presencia de un agonista sintético del CB1. Los ratones sin CB1 no presentaban esta disminución.

Katona y col (2006) realizaron un experimento en el que demostraron que la DGL, enzima responsable de la síntesis de 2AG se expresa en las neuronas hipocámpales principales y está específicamente concentrada en las cabezas de las espinas dendríticas que están rodeadas por anillos presinápticos de neuronas excitadoras. Mostraron también evidencias anatómicas de la presencia de CB1 en estas terminales presinápticas. Estos datos sustentan la hipótesis de que los endocannabinoides, en este caso el 2AG se sintetiza postsinápticamente y viaja hasta la presinápsis glutamatérgica en donde se expresa el CB1. Con respecto a la síntesis de ANA, a pesar de que está bien documentada en el hipocampo (Devane y Axelrod, 1994), hasta el momento no hay algún reporte que sugiera la exclusividad de los mecanismos enzimáticos en la región postsináptica o presináptica. En resumen, las evidencias sugieren que en relación a la transmisión glutamatérgica, el CB1 se encuentra presente en la región presináptica, y su activación resulta en la inhibición de la liberación

de glutamato dando como resultado una disminución de la respuesta postsináptica.

2. El Sistema canabinérgico, Transmisión GABAérgica

Hipocampal

Una de las primeras evidencias de la presencia de CB1 en células GABAérgicas fue aportada por Tsuo y col (1999). En su estudio se utilizaron anticuerpos para identificar células que expresaban el CB1 y para determinar el tipo de neurotransmisor que liberaban. Estos autores reportan que prácticamente todas las células teñidas para CB1 que pudieron observar eran del tipo GABAérgicas. Sin embargo no todas las células GABAérgicas que encontraron expresaban el CB1. Estas células fueron encontradas principalmente en el stratum pyramidale en la región CA1 y CA3; mientras que, en el giro dentado se pudieron localizar en la capa molecular, como se observa en la figura 3.8.

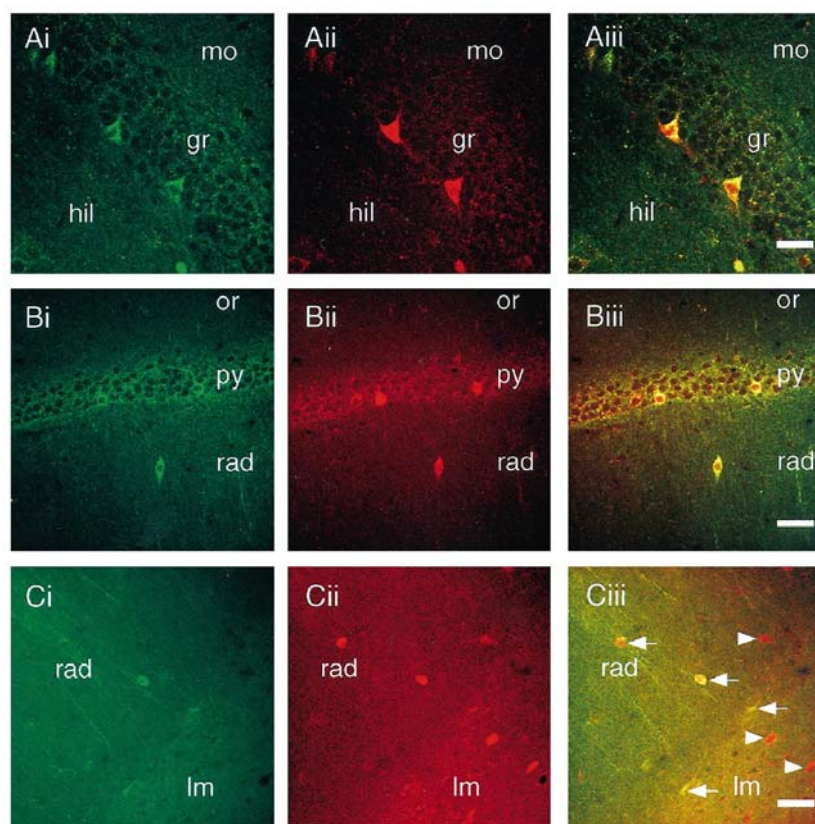


Figura 3.8 Inmunofluorecencia del CB1 y GABA en la formación hipocámpal (tomado de Tsuo y col, 2000). **(A)** Giro dentado, **(B,C)** CA1.

(Ai) Inmunofluorescencia para CB1 en verde en la capa granular (gr). (Aii) Inmunofluorescencia para GABA en rojo, se observan las mismas neuronas que en Ai. (Aiii) Sobreposición de Ai y Aii. Donde existe co-localización puede observarse en color amarillo indicando que estas células GABAérgicas también expresan el CB1. (Bi) Muestra dos neuronas positivas para CB1 en el stratum piramidale (py) y una en el stratum radiatum (rad). (Bii) las mismas neuronas positivas para GABA. (Biii) Sobreposición de Bi y Bii. (Ci) Neuronas positivas para CB1 en el stratum radiatum (rad) y lacunoso moleculare (lm). (Cii) Neuronas positivas para GABA. (Ciii) Sobreposición de Ci y Cii, en este caso se puede observar como solo algunas neuronas son positivas para CB1 y GABA (amarillas, flechas completas); mientras que otras son solo positivas para GABA (rojo, cabezas de flecha). Barras de referencia = 20 μm para A y 50 μm para B y C.

Después de este trabajo, se encontraron aun mas evidencias sustentando la presencia del CB1 en sinapsis GABAérgicas. El grupo de Tamás F Freund reportó que la administración de WIN 55,212-2 redujo la liberación de GABA inducida por estimulación eléctrica en rebanadas de hipocampo. Este efecto resultó ser dependiente del CB1, como pudo comprobarse mediante la administración conjunta con SR 141716A (Katona y col, 1999). Más adelante Hoffman y Lupica (2000) confirman estos resultados utilizando rebanadas de hipocampo de cerebro de rata. En su estudio demuestran que las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) se ven disminuidas por la administración de WIN 55,212-2 en forma dosis dependiente y sensible a la administración del antagonista SR 141716A.

Acompañando a estos estudios en cerebro de rata surgieron otros estudios en cerebro de humano, en donde pudieron observarse prácticamente los mismos resultados: en el hipocampo se localizaron altas concentraciones de CB1 (Glass y col, 1997; Katona y col, 2000). Específicamente el trabajo de Katona y col; exploró la presencia del CB1 en interneuronas GABAérgicas encontrando básicamente los mismos resultados que en los trabajos realizados en ratas.

En un esfuerzo por determinar exactamente las consecuencias de la activación del CB1 en interneuronas GABAérgicas hipocampales, Hoffman y col. (2003) realizaron registros en diferentes regiones del hipocampo. Los registros en las interneuronas del stratum radiatum y el stratum oriens mostraron que la administración de WIN 55,212-2 disminuyó significativamente los IPSCs; sin embargo, los EPSCs (Corrientes Postsinápticas Excitadoras) en

esas mismas neuronas no se vieron afectados. En contraste, los EPSPs en neuronas piramidales en la región de CA1 si se vieron disminuidos, como se había reportado previamente (Sullivan, 1999). Estos resultados sugirieron que la activación del CB1 en interneuronas del stratum oriens y stratum radiatum solo modula la transmisión GABAérgica; mientras que, en la región de CA1 además de modular la transmisión GABAérgica también modula la transmisión glutamatérgica.

Como hemos visto en los apartados anteriores, una de las principales funciones del sistema canabinérgico es la modulación de la liberación de neurotransmisores. Hasta el momento, solo hemos observado ejemplos de modulación de GABA y glutamato; sin embargo, también hay evidencias de su influencia sobre la liberación de otros neurotransmisores. Por ejemplo, en 1978 se reportó por primera vez que la liberación de acetilcolina en el hipocampo disminuía por la administración de THC (Revuelta y col, 1978). Más adelante Gessa y col (1998) confirman estos resultados mediante la medición de acetilcolina en el hipocampo en ratas en libre movimiento mediante la técnica de micro-diálisis. En este estudio se administraron dos dosis de THC (1 y 5 mg/Kg i.p.) y dos dosis de WIN 55,212-2 (5 y 10 mg/kg i.p.). En todos los tratamientos pudo observarse una disminución en la liberación de acetilcolina hipocampal hasta en un 50% y este efecto fue bloqueado por el SR 141716A. Contrario a estos datos Acquis y col. (2000) reportan que la administración sistémica de WIN 55,212-2 aumenta la liberación de acetilcolina hipocampal, en una forma dosis dependiente y sensible a SR 141716A. Las dosis utilizadas fueron, 10, 37 75 y 150 µg/kg por vía intravenosa. Los autores argumentan que las discrepancias entre ambos estudios están en las dosis, significativamente menores en el estudio de Acquis y en la ruta de administración. Esta contradicción fue resuelta en el 2003, cuando se administro i.p. diferentes dosis de WIN 55,212-2 (0.5, 1 y 5 mg/kg). Aquí pudo observarse que la dosis de 5mg/kg era efectiva para reducir la liberación de acetilcolina; mientras que la dosis de 0.5mg/kg aumento la liberación. La dosis de 1mg/kg no produjo cambios (Tzavara y col, 2003). En este mismo estudio pudo observarse que ambos efectos eran bloqueados por la administración de SR 141716A. La diferencia es que la administración de este antagonista directamente al

hipocampo era efectiva para bloquear el efecto de la dosis más alta de WIN 55,212-2 pero no el de la más baja. Por el contrario la administración de SR 141716A directamente al septum fue efectiva para bloquear el efecto de la dosis más baja pero no el de la dosis más alta de WIN 55,212-2.

Por otro lado, Nava y col, (2001) administraron THC y observaron la ya descrita disminución de acetilcolina. Además también evaluaron la conducta en la tarea de alternancia en el laberinto T (tarea dependiente de hipocampo), observando un aumento en el número de errores correlacionado con la disminución de acetilcolina. Todos los efectos de THC fueron bloqueados mediante el SR141716A.

Como hemos visto en el apartado de hipocampo y memoria, la acetilcolina es uno de los neurotransmisores involucrados en los procesos mnémicos. En algunos estudios se ha observado que su presencia en el hipocampo facilita procesos plásticos como la LTP. El sistema canabinérgico se convierte así en otro de los potenciales campos de estudio para el sistema canabinérgico. El efecto dual reportado por Tzavara y col (2003) es muy interesante ya que sugiere que dependiendo de la cantidad de cannabinoides presente puede modificarse en un sentido o en el totalmente opuesto los efectos sobre otros sistemas. Esto adquiere importancia en el contexto del siguiente apartado donde revisaré los estudios en donde se muestran los cambios en los niveles del sistema canabinérgico dependiendo de diversas condiciones ambientales.

Con respecto a la actividad del hipocampo se ha descrito un efecto bifásico en la excitabilidad hipocámpal inducida por THC, en donde el potencial de campo se facilitó a dosis bajas entre 2 y 4 mg/kg mientras que fue inhibido a dosis altas de 16 mg/kg (Vardaris y Weisz, 1977; Weisz y col, 1982). Este estudio fue realizado en animales anestesiados. Posteriormente, en un estudio hecho en rebanadas de hipocampo se confirmó este mismo efecto bifásico dependiente de la dosis de THC (Kujtan y col, 1983). Este efecto bifásico es consistente con los experimentos sobre la liberación de acetilcolina, previamente mencionados (Tzavara y col, 2003).

En 1986 Wilkinson y Pontzer realizaron registros en animales en libre movimiento y en animales anestesiados en dos regiones del Hipocampo, el

CA1 y el GD. Encontraron que la administración sistémica de THC disminuyó la excitabilidad en la región de CA1 en ambos casos. Tanto la actividad sináptica como la amplitud de la espiga poblacional se encontraron deprimidas.

Un poco más adelante a finales de la década de los ochentas, se realizó uno de los primeros intentos de relacionar al sistema canabinérgico con indicadores de plasticidad sináptica. En este estudio pudo observarse un efecto bifásico en la modulación de la duración de la LTP en la región de CA1, en rebanadas de hipocampo de rata, mediante la administración de THC de una manera dosis dependiente (Nowicky y Teyler, 1987). En este estudio se hace énfasis en que la administración de THC no afectó el componente temprano de la LTP o potenciación post-tetánica y tampoco afectó la magnitud de la potenciación, solamente la duración de la misma. Esto sugirió que los mecanismos de almacenamiento de largo plazo estaban afectados.

En conjunto, los experimentos electrofisiológicos citados coinciden en el hecho de que la administración de THC disminuye la excitabilidad del hipocampo, ya sea en preparaciones de rebanadas hipocámpales o en animales en libre movimiento. Esta disminución en la excitabilidad es dosis dependiente; aunque existen reportes en donde el efecto contrario puede observarse a dosis bajas. Como hemos mencionado también, existe evidencia clara demostrando la presencia del CB1 en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas; siendo esta una posible explicación para los efectos bimodales de la administración del THC. Posterior a este periodo y con el descubrimiento del CB1 y agonistas sintéticos y naturales, los estudios al respecto aumentaron considerablemente. Por ejemplo, se reportó que el WIN 55,212-2 y la anandamida bloquearon la LTP en forma dosis dependiente en la región de CA1, en rebanadas de cerebro de rata. Además, este efecto fue bloqueado por el antagonista SR141716A (Terranova y col, 1995).

Consistente con los resultados anteriores y apenas después del descubrimiento del 2AG (Mechoulam y col, 1995), Stella y col (1997) demuestran que esta sustancia se pega al CB1 que es liberado en el hipocampo de ratas en forma dependiente de calcio mediante la activación de las colaterales de Shaffer.

Hasta ese momento la literatura había mostrado consistentemente que la activación del sistema canabinérgico resultaba en la inhibición de la transmisión hipocampal. Este efecto daba como resultado dificultades en el establecimiento de procesos plásticos como la LTP. Se sugirió, consecuentemente, que estos efectos podrían estar mediados por la inhibición de sinapsis glutamatérgicas. Sin embargo, la también aceptada presencia del CB1 en sinapsis GABAérgicas sugería que la excitabilidad del hipocampo también podría verse facilitada en presencia de los canabinoides.

Las principales evidencias provienen de dos estudios en el 2001 en los que se describió que la “Supresión de la Inhibición inducida por Despolarización” (DSI por sus siglas en Inglés) era debida a la participación del sistema canabinérgico (Wilson y Nicoll, 2001; Ohno-Shosaku y col, 2001). Estos autores describen que en rebanadas de hipocampo (Wilson y Nicoll, 2001) y en cultivos de células hipocampales (Ohno-Shosaku et al, 2001) la excitación transitiva de una célula piramidal resulta en la supresión transitiva de la célula GABAérgica que inerva a esa célula piramidal. Esta inhibición es dependiente del CB1 y de la liberación de canabinoides endógenos; además, sugiere que este tipo de transmisión es retrograda (Fig. 3.9).

Con este antecedente Carlson y col (2002) hipotetizaron que la inducción de LTP en células hipocampales podría verse facilitada en presencia de DSI. De esta forma, ellos registraron simultáneamente las EPSCs de células piramidales del hipocampo y los potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP). Lo que pudieron observar es que en presencia de una estimulación débil (20 pulsos a 50Hz) no era posible evocar LTP en ninguno de los dos niveles, fEPSP o EPSCs. Sin embargo, si previamente a la estimulación débil se producía DSI mediante un segundo de despolarización (cambiar el potencial de -70mV a 0mV), entonces se podía observar LTP a nivel de la célula piramidal (EPSCs) pero no a nivel de campo fEPSP. Este efecto fue dependiente del tiempo transcurrido entre la aplicación de la DSI y de la estimulación débil, debido a que se había mostrado que la DSI duraba hasta 30 seg. (Wilson y Nicoll, 2001). Esto quería decir que la inhibición transitiva de la transmisión GABAérgica que estaba inervando a la célula piramidal registrada

duro hasta 30 segundos, tiempo en el cual era posible facilitar la inducción de LTP. En la figura 3.9 se muestra un esquema de lo que estaría ocurriendo.

Estos estudios, lejos de mostrar una contradicción con los estudios donde se muestra la inhibición de la LTP en el hipocampo, demuestran que el sistema canabinérgico actúa en la misma forma en las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, es decir, inhibiendo la liberación del neurotransmisor. Sin embargo, si se administra una dosis de agonista que afecte a ambas terminales (como en el caso de la ingestión de marihuana), el resultado será una inhibición generalizada de la liberación de ambos neurotransmisores, el GABA y el glutamato. Mientras que si solo se afecta un tipo específico de terminales, como lo mostrado en el artículo de Carlson y col, (2002), podrá afectarse la transmisión sináptica de forma mas específica, únicamente inhibiendo la liberación de GABA o de glutamato, esto último quizás sea mas cercano a la fisiología. En la figura 3.9 se ejemplifican las consecuencias de inhibir la liberación de glutamato (Fig. 3.9 a) o GABA (Fig. 3.9 b) mediante los endocannabinoides, o de GABA y glutamato juntos mediante la administración un agonista exógeno (Fig. 3.9 C).

Tomando como referencia los experimentos anteriores Chevalleyre y Castillo, (2003) realizaron experimentos para demostrar la implicación del sistema canabinérgico en otro tipo de plasticidad sináptica, la LTD. Trabajando con rebanadas de hipocampo, estos autores hipotetizaron que una inhibición transitiva como la DSI podía reflejarse en cambios plásticos a largo plazo más allá de 30 seg. Lo primero que reportan es que la estimulación que produce LTP en células piramidales del hipocampo también produce LTD en interneuronas GABAérgicas hipocampales en la región del stratum radiatum. Sugieren que esta LTD esta facilitando el mantenimiento de la LTP y demuestran que esta LTD es dependiente de la liberación de cannabinoides endogenos y activación presináptica del CB1. Estos autores llaman a este fenómeno "LTD heterosináptica" y demuestran que la activación de los receptores mGLUR1/5 es indispensable para que se liberen los cannabinoides endógenos en la región dendrítica de las células piramidales estimuladas. Estos endocannabinoides producirán una activación de los CB1 en las interneuronas GABAérgicas en la región de stratum radiatum que resultará en

una LTD de largo plazo en estas células. Este mecanismo resultará en la inhibición de la inhibición y por lo tanto facilitación de la inducción de LTP. Esto puede observarse gráficamente en la figura 3.9 b.

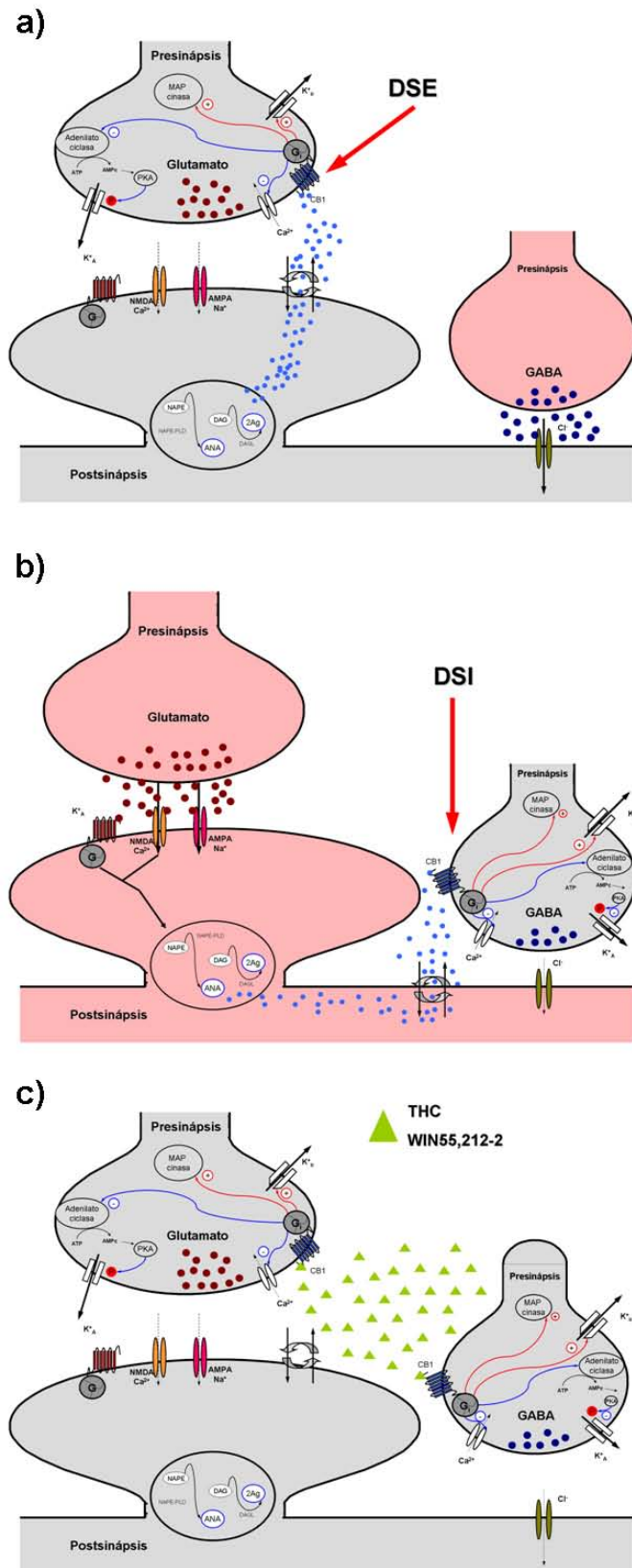


Figura 3.9 (a) Representación de la Supresión de la Excitación inducida por Despolarización (DSE); (b) Supresión de la Inhibición inducida por Despolarización (DSI); (c) Representación de lo que podría ocurrir cuando se administra cannabinoides de manera exógena. (a) En condiciones normales la DSE sería el resultado de la activación de los CB1 en las terminales presinápticas glutamatérgicas dando lugar a una disminución en la excitabilidad postsináptica. (b) La DSI es el resultado de la activación de los CB1 en las células GABAérgicas dando lugar a la inactivación de estas terminales y por lo tanto una desinhibición de la célula postsináptica. (c) En el caso de las administraciones exógenas de cannabinoides el resultado podría ser la activación de todos los CB1 dando lugar a una inactivación generalizada. En los esquemas se omiten los CB1 postsinápticos para los cuales existe cierta evidencia en la literatura (véase el texto). En los esquemas el color gris representa la inactividad de la célula, el color rojo representa la actividad de la célula.

3. Evidencia conductal de la participación del sistema canabinérgico en la función hipocampal y la memoria.

Entre los primeros estudios realizados destaca el reporte de Campbell y col, (1983). En este estudio se entrenó a ratas a realizar una tarea de discriminación entre dos tonos auditivos de distintas frecuencias, en donde una frecuencia indicaba la presencia de un reforzador. Mientras los sujetos realizaban la tarea se registraron los potenciales evocados auditivos en el hipocampo. Lo que pudo observarse es que los sujetos bajo la administración de TCH presentaron un deterioro en la solución de la tarea de discriminación. Dicho deterioro estuvo correlacionado con cambios significativos en la arquitectura del potencial evocado. Este efecto se presentó en forma dosis dependiente.

En otro donde se utilizó la tarea de “retardo en igualación a la muestra (DMTS por sus siglas en Inglés)” una tarea en la que se ha sustentado ampliamente la participación la formación hipocampal (para revisión Squire y Zola, 1988). Se observó que al igual que con las lesiones del hipocampo, la administración del THC producía una incapacidad de los sujetos para realizar esta tarea. Se mostró un importante aumento en el número de errores. La diferencia es que en este caso el efecto era completamente reversible una vez transcurrido cierto tiempo después de la administración (Heyser y col, 1992). También se demostró que estas deficiencias estaban correlacionadas con una disminución en el disparo de células hipocampales de las regiones de CA1 y CA3. Además la ocurrencia de células disparando en ensambles (varias células disparando coordinadamente) se vio también comprometida (Heyser y col, 1992; Hamspon y Deadwyler, 2000).

Estos estudios se vieron corroborados en el estudio de Robbe y col. (2006) en donde se mostró también que la coordinación hipocampal se ve afectada en presencia de agonistas canabinérgicos, específicamente el ritmo theta hipocampal. Adicionalmente, se pudo observar que este efecto era debido a un desacoplamiento de la actividad coordinada más que la disminución en la frecuencia de disparo. Existen evidencias que sugieren que la capacidad del hipocampo para sincronizar la actividad de sus células a distintas frecuencias

de disparo, es una condición necesaria para su correcto funcionamiento y para el almacenamiento de la información (véase Buzsaki, 2002; también véase capítulo 16 en Buzsaki, 2006)

Con respecto a la memoria espacial, Lichtman y col (1995) demuestran que en el laberinto radial, la administración sistémica de THC, WIN 55,212-2 y CP-55,940 retardan la resolución del laberinto y aumentan el número de errores. Además, demuestran que la administración intrahipocampal de CP-55,940 produce un aumento en el número de errores. En este mismo estudio también se utilizó ANA de manera sistémica sin encontrar un aumento en el número de errores o en los tiempos de ejecución. En un estudio complementario, estos mismos autores probaron la participación del CB1 en los efectos del THC sobre el laberinto radial, mostrando que el deterioro provocado por la administración sistémica de THC era bloqueado por el antagonista SR141716A (Lichtman y Martin, 1996). Con estos estudios estos autores postularon una de las más influyentes ideas sobre el estudio del sistema canabinérgico, “su participación en la memoria de corto plazo”. En Hampson y Deadwyler (1998) puede encontrarse una revisión al respecto.

Mas adelante Mallet y Beninger (1998) utilizando un paradigma dependiente de hipocampo (retardo en la desigualación a la posición) mostraron los ya conocidos efectos de la administración de ANA y THC sobre la memoria. Mientras que la administración sola del antagonista SR141716A no tenía ningún efecto en la solución de la tarea. Los efectos de THC y ANA fueron bloqueados mediante SR141716A. Complementariamente a estos estudios y al de Lichtman y col, (1995) en el laberinto radial de ocho brazos, se administró SR141716A con el objetivo de facilitar la ejecución en esta tarea. Los resultados mostraron una disminución en el número de errores dependiente del bloqueo del CB1. En consistencia con estos resultados, los mismos efectos facilitadores se han observado en la tarea de laberinto elevado en T (Takahashi y col, 2005).

El avance en el estudio molecular del sistema canabinérgico ha abierto la puerta a nuevas líneas de investigación, implicando el desarrollo de nuevos fármacos o el desarrollo de ratones trans-génicos carentes de alguna proteína

implicada en el sistema canabinérgico. Por ejemplo se demostró que los ratones “Knockout” del CB1 conocidos como CB1^{-/-} muestran curvas de aprendizaje iguales a las de los ratones normales en la versión clásica del “Water Maze” (laberinto acuático, los sujetos tienen que encontrar la plataforma que se encuentra fija en un lugar del espacio y que esta sumergida en un estanque lleno de agua). Sin embargo en la versión de reversión de la misma tarea (la plataforma se mueve al lado opuesto del estanque, una vez que los sujetos ya habían aprendido la posición de la plataforma), los sujetos continúan visitando el lugar donde se encontraba originalmente la plataforma, mostrando un claro deterioro en la extinción de la tarea (Varvel y Lichtman, 2002). Ese mismo grupo reportó que los ratones mutantes que no expresan la proteína FAAH (enzima que degrada a los endocannabinoides. Su ausencia o bloqueo da como resultado niveles elevados de anandamida, FAAH^{-/-}) no mostraban ningún efecto en la adquisición de la versión de plataforma fija en el Water Maze. Sin embargo, al contrario de los ratones sin CB1, estos adquirían más rápidamente la versión de reversión, sustentando así la hipótesis de que los endocannabinoides pueden estar implicados en la extinción (Varvel y col, 2006). También en este estudio se mostró que estos ratones eran más susceptibles a los efectos adversos de la administración de ANA y OLE. Como complemento a estos estudios se mostró que el bloqueo farmacológico de la FAAH, así como los ratones con el genotipo FAAH^{-/-} muestran una tasa de extinción más rápida que los ratones normales. Además el bloqueo del CB1 con SR141716A impide este efecto (Varvel y col, 2007). Estos datos sustentan que los cannabinoides endógenos al unirse al CB1 facilitan la extinción de una tarea como la del Water Maze. Esta idea también ha sido probada en otros paradigmas de memoria, como en el condicionamiento de miedo modulado por la amígdala (Marcicano y col, 2002). La idea de estos y otros estudios (Varvel y col, 2005; Pamplona y col, 2006; Niyuhire y col, 2007) es que la señalización del CB1 es necesaria para extinguir una conducta.

Integrando la evidencia conductual y electrofisiológica con respecto al hipocampo y el sistema canabinérgico podemos llegar a algunas conclusiones:

- La activación específica del CB1 en neuronas glutamatérgicas resultará en la inhibición de sus blancos postsinápticos; La activación específica

del CB1 en neuronas GABAérgicas resultará en la excitación de sus blancos postsinápticos.

- La activación del sistema canabinérgico mediante administraciones de ligandos exógenos dará como resultado la inhibición generalizada del hipocampo. También interfiere con la plasticidad sináptica.
- En condiciones de estimulación inespecífica del CB1 el resultado conductual parece ser la incapacidad para crear nuevos recuerdos. Al contrario, su inhibición puede facilitar los procesos de memoria.
- Existe evidencia que sustenta su participación en procesos de extinción.

3.5 El sistema canabinérgico en el Núcleo Estriado

En este trabajo hemos decidido incluir al núcleo estriado como una de las estructuras de estudio por tres razones fundamentales, la primera es su participación en el aprendizaje y la memoria. La segunda es que exhibe una gran densidad del CB1 como puede observarse en la figura 3.10 y la tercera es que en comparación con el hipocampo existen muy pocos estudios tratando de esclarecer el papel del sistema canabinérgico en el estriado.

Como lo muestra la figura 3.10, gran parte de los núcleos basales expresan el CB1. Sin embargo, el más estudiado hasta el momento es el núcleo estriado. (Fig. 3.10 A). También puede observarse que su mayor expresión se encuentra en la región dorsolateral, que como hemos mencionado en el apartado de memoria, participa en el almacenamiento de información de tipo estímulo respuesta. En el estriado dorso lateral se ha podido demostrar que el CB1 se encuentra en grandes cantidades a nivel presináptico y postsináptico (Kofalvi y col, 2005). Su expresión es importante alrededor de los

cuerpos celulares. Como puede observarse en la figura 3.11 que fue tomada del trabajo de Fusco y col (2005) diversos tipos de interneuronas en el estriado expresan el CB1; en particular, casi el 90% de las interneuronas inmunopositivas para parvoalbúmina coexpresaron el CB1. También lo expresaron en menor proporción las interneuronas inmunopositivas para neuropéptido "Y" y las interneuronas colinérgicas. Diversos estudios electrofisiológicos que revisaremos a continuación han demostrado que al igual que en el hipocampo el CB1 se expresa en células glutamatérgicas y GABAérgicas.

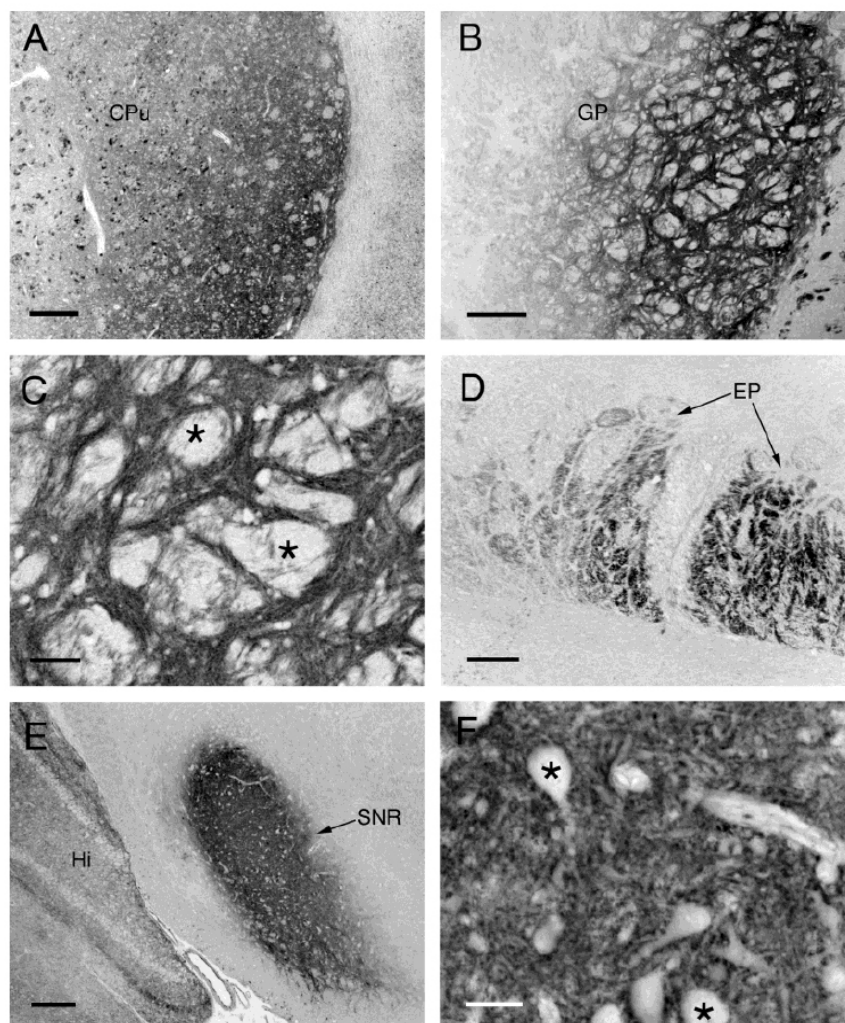


Figura 3.10 Inmunoreactividad al CB1 en los núcleos de la base (tomado de Egertova y Elphick, 2000). **(A)** Se observa una gran reactividad en

la región dorsolateral del núcleo estriado. **(B)** Reactividad en la región del Globo Pálido (GP) **(C)** Magnificación del globo pálido, al igual que en el hipocampo la reactividad ocurre alrededor de los cuerpos celulares que no muestran marca. **(D)** Núcleo entopeduncular. **(E)** Sustancia Negra. **(F)** Magnificación de la sustancia Negra. Barras de referencia= 200 μm en A, B y E; 100 μm en D, 50 μm en C y 20 μm en F.

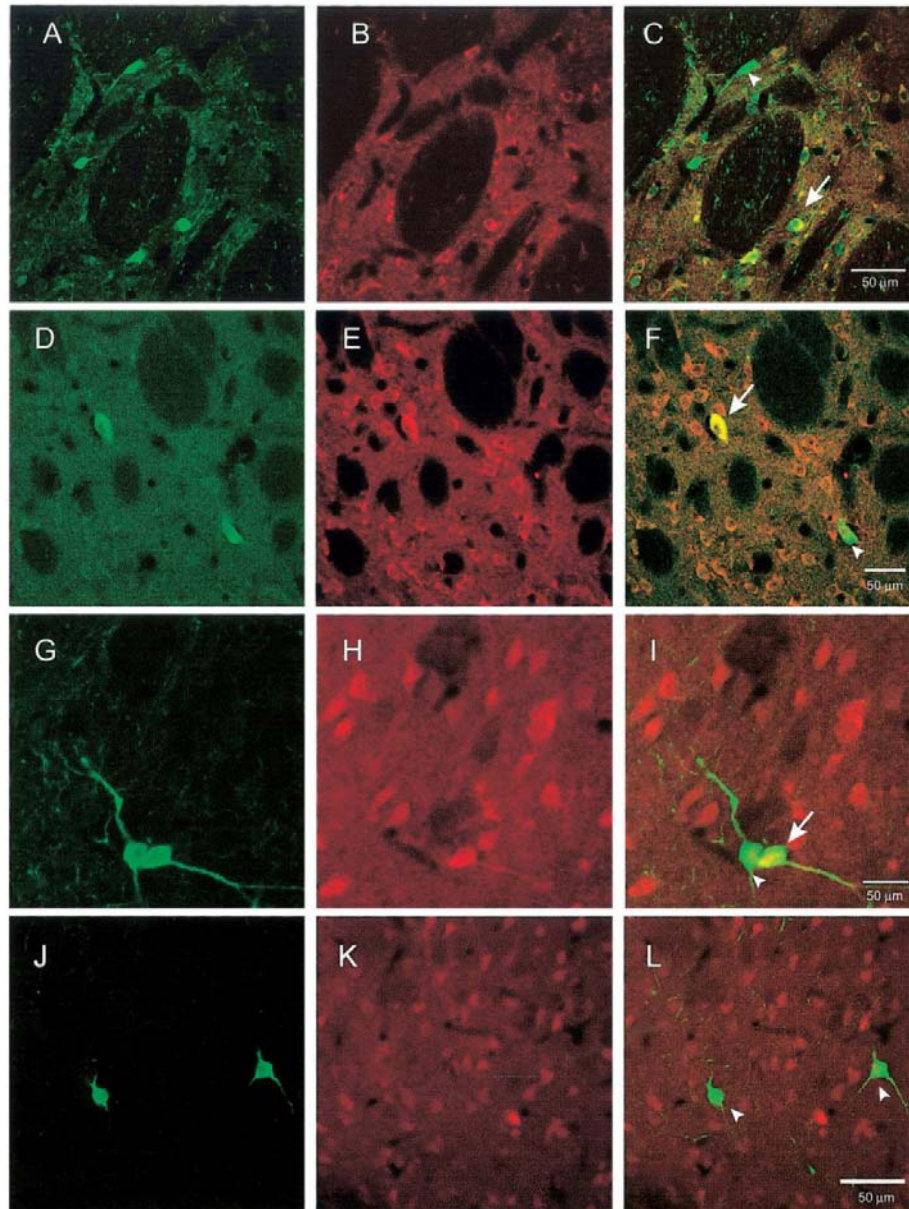


Figura 3.11 Inmunoreactividad al CB1 en núcleo estriado (tomado de Fusco y col, 2004). En todos los casos la inmunoreactividad al CB1 se representa en rojo en los paneles centrales, para parvalbúmina (A) colin-acetil-transferasa (D), Oxido nítrico sintetasa (G) y calretinina (J) se muestra en verde y la combinación de ambas tinciones se muestra en los paneles de la derecha, en este caso los lugares en donde se coexpresa el CB1 con cualquiera de las anteriores proteínas pueden observarse en amarillo. **(A-C)** Parvalbúmina - CB1 **(D-F)** Colin-Acetil-Transferasa - CB1 **(G-I)** Oxido-Nítrico-Sintetasa - CB1 **(J-L)** Calretinina - CB1

*1. El Sistema canabinérgico Transmisión GABAérgica
Estriatal*

Al igual que en la formación hipocampal, la activación del CB1 en el estriado dorsolateral disminuye la liberación de GABA (Szabo y col, 1998). En este estudio también sugirieron que esta disminución era consecuencia de un mecanismo presináptico. Además se ha observado la presencia de ARNm para el CB1 en interneuronas GABAérgicas en el estriado dorsolateral (Marcicano y Lutz, 1999). Un poco más adelante Wallmichrath y Szabo (2002) mostraron que las proyecciones GABAérgicas originadas en el núcleo caudado putamen y que llegan a la sustancia negra, son moduladas mediante el CB1 que se expresa presinápticamente. El efecto de la activación del CB1, resulta en la disminución de las corrientes inhibitoras en las células dopaminérgicas nigroestriatales. En el 2005 se demostró que el receptor a canabinoides se encontraba en las presinápsis GABAérgicas (Köfalvi y col, 2005). En este mismo estudio también se demostró que la liberación de GABA era modulada a la baja en presencia de agonistas canabinérgicos y este efecto era bloqueado mediante los antagonistas SR141716A y AM251. El estudio de Köfalvi y col. conjuntó y confirmó los datos previamente citados (Szabo y col, 1998; Marcicano y Lutz, 1999).

Un poco más adelante en un estudio más específico Narushima y col. (2006), demostraron que al igual que en el hipocampo, el sistema canabinérgico está implicado en la DSI que ocurre en las interneuronas de disparo rápido que están inervando a las neuronas espinosas medianas. La administración del SR141716A bloqueó completamente la inducción de la DSI y la administración de WIN 55,212-2 semejó los efectos de la despolarización necesaria para producir DSI. En ese mismo año se publicó el trabajo de Mátyás y col (2006); en donde se realizó un análisis detallado de la localización de los CB1 en los núcleos de la base. Los resultados de su estudio son parcialmente contradictorios a los de Köfalvi et al (2005), ya que no reportan la presencia del CB1 en la región postsináptica. Sin embargo, coinciden en que el CB1 se encuentra principalmente expresándose a nivel presináptico. También coinciden en que se encuentra en presinápsis GABAérgicas.

Una conclusión que puede obtenerse hasta el momento es que el sistema canabinérgico en el estriado al igual que en el hipocampo se relaciona principalmente con las terminales presinápticas. Además, también aquí la liberación de GABA se reduce ante la activación o el bloqueo del CB1. La evidencia hasta el momento solo es suficiente para implicar al CB1 en la DSI. Sin embargo, como veremos a continuación, el sistema canabinérgico como modulador del sistema glutamatérgico ha sido ampliamente estudiado en el estriado.

2. El Sistema canabinérgico y La Transmisión

Glutamatérgica Estriatal

Como lo discutimos en el apartado correspondiente al estriado, uno de los transmisores fundamentales en el funcionamiento de ésta estructura es el glutamato. Las proyecciones que llegan desde la corteza cerebral son fundamentales para su funcionamiento. Por este motivo, el sistema canabinérgico ha sido ampliamente estudiado en el estriado con respecto a la transmisión glutamatérgica.

El primer estudio realizado al respecto demostró que el WIN 55,512-2 administrado a rebanadas que incluían al estriado dorsolateral disminuía sustancialmente la transmisión Glutamatérgica corticoestriatal. Estos efectos eran bloqueados a través del CB1 y se propuso también que el efecto podría ser a nivel presináptico (Huang y col, 2001). En este estudio se demostró también que el efecto estaba mediado a través de una proteína $G_{i/o}$, y que no estaba relacionado con el receptor $GABA_A$ o $GABA_B$. Estos resultados fueron confirmados por Gerdeman y Lovinger (2001) también estudiando el estriado dorsolateral y utilizando HU-210 y WIN 55,212-2 y por Robbe y col (2001) en el estriado ventral o núcleo acumbens utilizando CP55940 y WIN 55,212-2. Mas tarde, en el 2005, se demostró que la activación del CB1 también modula la liberación de glutamato en las sinapsis que van desde los núcleos subtalámicos al globo pálido (Freiman y Zsabo, 2005).

Las implicaciones funcionales de la disminución en la liberación de glutamato en el estriado comenzaron a explorarse casi al mismo tiempo. Como se ha mencionado la LTD es un tipo de plasticidad sináptica que puede evocarse en el estriado y parece ser fundamental para su funcionamiento. Se ha mostrado que el sistema canabinérgico es indispensable para la inducción de LTD en el estriado (Gerdeman y col, 2002; Ronesi y Lovinger, 2005). En este estudio se demostró que en rebanadas de cerebro de ratones mutantes sin CB1, era imposible producir LTD. También se mostró que la administración de agonistas canabinérgicos producía LTD en los ratones normales mientras que en los mutantes no y que la inducción de LTD en ratones normales era inhibida en presencia del antagonista del CB1, el SR141716A. Además, se mostró que la liberación de ANA desde la postsinápsis producía LTD y este efecto era bloqueado por AM251. Todos estos datos juntos sustentaron la hipótesis de que los cannabinoides deben liberarse postsinápticamente, viajar hasta la presinápsis y allí activar al CB1 en terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza para producir LTD. Los mismos resultados fueron obtenidos en el estriado ventral (Robbe y col, 2002).

A nivel conductual son realmente muy escasos los trabajos que intentan esclarecer la participación del sistema canabinérgico en el estriado dorsolateral. En su estudio Shi y col (2005) exploraron la conducta de actividad locomotora espontánea y la marcha forzada en una banda sin fin en ratas, mientras hacían esto también registraron el estriado dorsolateral, los núcleos subtalámicos, el globo pálido y la sustancia negra. Lo que encontraron es que la administración de THC de manera sistémica producía una disminución en la actividad locomotora espontánea y alteraba los patrones de marcha en la banda sin fin. En correlación con estas mediciones, la frecuencia de disparo de las neuronas en todos los núcleos registrados siempre fue significativamente menor en presencia del agonista canabinérgico.

Por su parte González y col (2006) reportan que la administración de dosis bajas del antagonista SR141716A puede contrarrestar algunos síntomas motores en un modelo de la enfermedad de Parkinson en ratas; sin embargo, las dosis altas de este mismo fármaco no tienen ningún efecto sobre la conducta.

En otro estudio Kreitzer y Malenka (2007) realizando registros en las células que forman la vía directa e indirecta de comunicación de los núcleos basales logran demostrar que las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta son muy susceptibles a presentar LTD mediada por endocannabinoides. Se establece además, la necesidad de la activación de los receptores dopaminérgicos D2 y se logra establecer una relación entre la ausencia de LTD y la presencia de síntomas parkinsonianos. Este es uno de los primeros experimentos en donde se muestra la necesidad de la LTD para el correcto funcionamiento de la conducta relacionada con el estriado. Además de los experimentos de Shi y col, Gonzales y col y Kreitzer y Malenka se han realizado otros explorando los efectos de los cannabinoides en el control motor (para revisión Sañudo-Peña y col, 1999).

Los experimentos hasta ahora mencionados, indican que el sistema canabinérgico en el núcleo estriado juega un papel fundamental en un tipo específico de plasticidad conocido como LTD. Hasta el momento, no se ha realizado ningún intento por relacionar al sistema canabinérgico estriatal con procesos cognitivos. A pesar de lo anterior, podemos enlistar algunas conclusiones:

- El CB1 se encuentra, al igual que en el hipocampo, altamente expresado a nivel presináptico y su papel ahí es el de modular la liberación de GABA y Glutamato.
- Hasta el momento, se ha demostrado que la inhibición de la liberación de glutamato por periodos prolongados resulta en LTD y esta es dependiente de la activación del CB1.
- La desestabilización del sistema canabinérgico mediante agonistas o antagonistas al CB1, puede resultar en problemas en el control motor.
- Se sugiere la necesidad del CB1 y la LTD para mantener el correcto funcionamiento estriatal; gracias a los estudios que muestran que los síntomas parkinsonianos pueden ser revertidos mediante la manipulación del sistema canabinérgico.

4. Variaciones Diurnas

4.1 Variaciones diurnas en el CB1 y los endocannabinoides

Después de haber revisado los aspectos más básicos del sistema canabinérgico ahora me encargaré de otro aspecto de gran relevancia: las variaciones diurnas. Como lo hemos mencionado antes, el sistema canabinérgico está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central. Además, presenta una expresión muy importante en el estriado y en el hipocampo. También hemos mencionado que una de sus principales funciones es la modulación de la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el GABA. Trabajos previos en nuestro laboratorio, en los que se buscaba una reactividad del CB1 ante diferentes condiciones experimentales como la privación selectiva de sueño MOR han revelado que la cantidad de CB1 no es constante a lo largo del ciclo luz oscuridad. En su estudio Martínez-Vargas y col (2003) han demostrado que el CB1 presenta variaciones diurnas en el puente de ratas, mostrando las más altas concentraciones a las 13:00 horas (fase de luz) y las más bajas a las 01:00 horas (fase de oscuridad). Estos mismos autores reportan que el CB1 en el hipocampo presenta sus más altas concentraciones durante la fase de luz (13:00hrs) y las más bajas durante la oscuridad (01:00hrs) (Martínez-Vargas y col, 2003, SFN). Por otro lado, también se ha demostrado la variación diurna en la concentración de los cannabinoides endógenos anandamida (Valenti y col, 2004; Murillo-Rodríguez y col, 2006) y del 2AG (Valenti y col, 2004) en el hipocampo, el estriado y la corteza cerebral de ratas. En este caso pudo encontrarse que anandamida presenta altas concentraciones en el hipocampo y en el estriado durante la fase de oscuridad mientras que durante la fase de luz sus niveles son muy bajos.

A pesar de que la literatura con respecto a las variaciones diurnas y el sistema canabinérgico es muy limitada estos resultados sugieren que el nivel de modulación canabinérgico ejercido en el hipocampo y el estriado podría variar dependiendo del ciclo luz oscuridad y por lo tanto el desempeño en las conductas relacionadas con estas estructuras también podría variar dependiendo del ciclo luz-oscuridad.

4.2 Variaciones diurnas en el la conducta

La idea de que la conducta exhibe variaciones diurnas, específicamente los procesos cognitivos, que en este caso abordamos mediante el sistema canabinérgico, fue antes estudiada por varios autores. Folkard (1975) propone en un estudio en sujetos hecho humanos, que la aproximación empleada para resolver una tarea varía dependiendo de la fase del ciclo en la que la tarea sea resuelta. Folkard reporta que los sujetos cambiaban de estrategia para encontrar palabras en un texto, dependiendo del ciclo luz-oscuridad. El cambio en la estrategia empleada sin embargo, no modificaba el resultado final de la misma. En esta misma línea de pensamiento May y col, (2005) entrenaron a sujetos humanos a resolver tareas de memoria implícita o explícita en dos puntos del ciclo luz oscuridad. Los resultados demostraron claramente que los sujetos eran mejores para resolver la tarea explícita en una fase del ciclo en comparación a la otra; mientras que la memoria implícita mostraba el patrón contrario. Estos autores sugieren que la evocación de la memoria implícita y explícita se encuentra sujeta a agendas circádicas distintas.

Estas ideas no han estado exentas de probarse en modelos animales. Por ejemplo, Antoniadis y col, (2000) utilizaron un modelo de condicionamiento de preferencia de contexto en ratones, en donde se asociaba un estímulo agradable a un contexto específico. En este estudio se comparo a ratones que tenían un patrón de actividad locomotora circadiana bien consolidado contra ratones que presentaban una perdida de ciclos circadianos. Los resultados indicaron que los ratones con el ciclo circadiano alterado no podían condicionarse como los ratones normales. Este estudio sugirió que el sistema de memoria encargado de la asociación del contexto con el reforzador (muy probablemente el hipocampo) no estaba funcionando correctamente en los sujetos sin ritmos circadianos.

Mas adelante se demostró que en una tarea dependiente de hipocampo (laberinto acuático de Morris, versión espacial) en donde un grupo de ratas fue sometido a alteraciones en su agenda circádica (adelantos de fase) y otro grupo permaneció en condiciones normales, pudo observarse que ambos grupos presentaban características similares en la adquisición de la tarea, sin

embargo el grupo con los cambios circádicos tuvo problemas para retener la tarea 10 días después de los entrenamientos (Devan y col, 2001). Estos datos sugirieron que la alteración de los ritmos circadianos interfiere con la consolidación de recuerdos codificados por el hipocampo.

A diferencia de los dos estudios anteriores Ralph y col, (2002) demuestran, utilizando una tarea de preferencia de lugar, en la que la integridad de los ritmos circadianos se respetó, que la recuperación de la información depende de la fase del ciclo en la que fue adquirida. Es decir, los sujetos que fueron entrenados en oscuridad recuperaron correctamente la tarea cuando los ensayos de prueba se realizaron en la fase de oscuridad pero no cuando se realizaron en la fase de luz y viceversa. Por su parte Chawdhury y Colwell (2002) entrenaron a ratones en dos versiones de la tarea de condicionamiento de miedo. La versión por clave, principalmente relacionada con la amígdala y la versión por contexto relacionada con el hipocampo y la amígdala. Sus resultados demuestran que los sujetos entrenados durante la fase de luz adquirirían más fácilmente la tarea que los sujetos entrenados durante la oscuridad, además eran más resistentes a la extinción de la tarea. Estos resultados se mantuvieron en condiciones de oscuridad constante sugiriendo su naturaleza circádica.

Estas referencias sugieren que la alteración natural de los ritmos, como ocurre en el envejecimiento como el mostrado en el trabajo de Andtomniadis y col, (2000), o bien provocada experimentalmente como en el trabajo de Devan y col, (2001), la capacidad para recuperar y consolidar la información se ve comprometida. En estos casos particulares, los autores se enfocaron en paradigmas clásicamente relacionados con memoria declarativa. También podemos decir, por los trabajos de Ralph y col, (2002) y Chawdhury y Colwell (2002) que la adquisición de tareas memoria así como su recuperación, son dependientes de los ritmos circadianos. Estos trabajos se han confirmado en condiciones similares en el trabajo de Valentinuzzi y col, (2004).

Diversos estudios han mostrado que la actividad electrofisiológica del hipocampo presenta variaciones diurnas. El primer estudio fue realizado por Barnes y col (1977) y reportan que la respuesta evocada por estimulación de la

vía perforante en la región del GD es significativamente mayor durante las horas de oscuridad que de luz, en una preparación en animales en libre movimiento, sugiriendo una mayor excitabilidad durante las horas de oscuridad. Estos estudios fueron confirmados utilizando registros crónicos (14 días) en ratas, en donde cada 15 minutos se evocaba una respuesta en el GD mediante la estimulación de la vía perforante. Al igual que en el estudio de Barnes y col, (1977), en la oscuridad pudieron observarse los valores de mayor amplitud (Cauler y col, 1984).

Harris y Tayler (1983) fueron mas allá de la simple evocación de la espiga poblacional y decidieron probar un modelo de plasticidad sináptica como la LTP. En su estudio en ratas, la evocación de LTP en el GD y CA1 resultó facilitada durante la fase de luz. Este trabajo contradice hasta cierto punto al de Barnes y col.; sin embargo, la evocación de la LTP es un proceso más complicado que la evocación de la sola respuesta sináptica. Como hemos visto se requiere de la activación de diferentes tipos de receptores, la activación de cascadas de segunda mensajería, así como de la síntesis de nuevas proteínas. Resultados similares a estos fueron encontrados en rebanadas de cerebro de ratón sacrificado durante la fase de luz y oscuridad. La LTP resultó ser más fácilmente evocada en las rebanadas de hipocampo correspondientes a la fase de luz (Raghavan y col, 1999).

Como podemos observar, existe evidencia conductual y electrofisiológica que sugiere que ciertos aspectos cognitivos podrían estar sujetos a las condiciones ambientales como el ciclo luz oscuridad. Con base en estos antecedentes, decidimos entrenar a ratas en el laberinto Barnes durante la fase de luz y durante la fase de oscuridad. Los resultados mostraron que las ratas entrenadas durante la fase de luz y oscuridad resolvían la tarea en los mismos tiempos de ejecución. Sin embargo, modificaron la estrategia para resolver el laberinto. Durante la fase de luz los sujetos resolvían la tarea utilizando principalmente una estrategia espacial mientras que durante la fase de oscuridad lo hacían utilizando una estrategia secuencial o serial (Rueda-Orozco et al, 2003, SFN).

5. Planteamiento de Problema, Hipótesis y Objetivos

5.1 Experimento 1, planeamiento del problema e hipótesis

Este experimento fue diseñado pensando en estudiar la función del sistema canabinérgico en la consolidación del aprendizaje de distintas estrategias, en el hipocampo y el núcleo estriado. Las siguientes son las razones por las que realizamos el experimento.

- El sistema canabinérgico es un sistema modulador implicado en la liberación de neurotransmisores y en mecanismos de plasticidad neuronal que se encuentra altamente expresado en el hipocampo y el núcleo estriado.
- El hipocampo y el núcleo estriado son dos estructuras relacionadas con la memoria declarativa y no declarativa respectivamente. En distintos modelos animales, incluyendo ratas, se ha demostrado que la activación de una u otra estructura resulta en la expresión de distintas estrategias para una tarea espacial.
- La modulación ejercida por el sistema canabinérgico en estas estructuras potencialmente podría participar en la expresión de distintas estrategias.
- Se ha demostrado que el sistema canabinérgico en el hipocampo (CB1, ANA y 2AG), y el estriado (ANA y 2AG) varía su expresión a lo largo del ciclo luz-oscuridad sugiriendo una modulación diferencial dependiente del ciclo.
- También se ha demostrado en diferentes paradigmas de memoria y en distintas especies animales incluidas el humano y la rata que la evocación así como la consolidación de la tarea están sujetas a ritmos circadianos y variaciones diurnas.

Por lo tanto nuestras hipótesis en el experimento 1 son:

- De acuerdo con los datos revisados, existen variaciones diurnas en la expresión de estrategias en una tarea espacial.
- La expresión de dichas estrategias es el resultado de la actividad diferencial del hipocampo y el estriado
- La expresión diferencial de las estrategias es modulada por la expresión diferencial del sistema canabinérgico.
- Hay una variación diurna en la expresión del CB1, en su mensajero y proteína en el hipocampo y el estriado.

5.2 Experimento 2 planeamiento del problema e hipótesis

Este experimento fue diseñado pensando en estudiar la función del sistema canabinérgico en el núcleo estriado en la extinción de la memoria. Las siguientes son las razones por las que realizamos el experimento.

- De acuerdo a la literatura el núcleo estriado está implicado en la adquisición y evocación de memorias de procedimiento.
- Por medio de administraciones sistémicas de fármacos agonistas o antagonistas del CB1 o mediante el uso de ratones genéticamente modificados, se ha sugerido que la activación del sistema canabinérgico es necesaria para la extinción.
- Existe evidencia que indica que el sistema canabinérgico es indispensable para la LTD, un tipo de plasticidad sináptica que ha demostrado ser necesaria para el correcto funcionamiento estriatal.

Por lo tanto nuestras hipótesis en el experimento 2 son:

- La extinción de la memoria de procedimiento ocurre en el núcleo estriado.

- La activación del sistema canabinérgico en el núcleo estriado es necesaria para la extinción de la memoria de procedimiento.
- El ciclo luz oscuridad modula los mecanismos de extinción de memorias de procedimiento.

5.3 Objetivos

1. Experimento 1

- Entrenar a ratas en dos puntos del ciclo luz-oscuridad (13:00 y 01:00) en el laberinto de Barnes, para mostrar que existe una variación diurna en la expresión de estrategias.
- Administrar ANA y un antagonista del CB1 (AM251) en el hipocampo y el estriado y valorar sus efectos en la ejecución en el laberinto de Barnes en ambas fases del ciclo luz-oscuridad.
- Realizar la cuantificación de proteínas y ARNm en el hipocampo y el núcleo estriado durante el ciclo luz-oscuridad.

2. Experimento 2

- Entrenar a ratas en el laberinto en T y verificar sus curvas de extinción. Además, correlacionar la actividad del estriado con el aprendizaje y la extinción en el laberinto en T mediante la técnica de c-Fos.
- Administrar un antagonista del CB1 en el estriado dorsolateral durante la fase de extinción en el laberinto en T.
- Determinar el efecto de la administración del antagonista al CB1 en el estriado durante la fase de extinción mediante la técnica de c-Fos.

6. Método

6.1 Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, entre 250 g y 300 g de peso, para todos los experimentos. Todas las ratas permanecieron alojadas en jaulas-habitación individuales en 2 bioterios con temperatura controlada y constante (23°C) y ciclos de luz-oscuridad 12-12. Las luces se encendían a las 08:00 hrs. en el bioterio 1 y a las 20:00 en el bioterio 2. Las ratas utilizadas en los experimentos de biología molecular fueron alojadas en jaulas habitación jumbo en grupos de 5 ratas por caja.

6.2 Aparatos

Para las pruebas conductuales se utilizaron los siguientes aparatos:

- Laberinto de Barnes (Fabricación casera)
- Laberinto en Cruz (Fabricación casera)
- Video cámara (Sony)
- Video grabadora (Phillips)
- Televisor (Sharp)
- Sistema productor de ruido blanco (fabricación casera)
- Bomba de micro-administración (Kd-Scientific modelo 200)
- Jeringas Hamilton 10µl

Para las técnicas de biología molecular se utilizaron los siguientes aparatos:

- Vortex (Diagger, VortexGenie 2)
- Balanza Analítica (Ohaus, mod. A5200)
- Balanza (Ohaus mod. cs-200)
- PHmetro (Corning-Pinnacle 530PHmeter)
- Agitador (Barnstead/Thermolyne mod. S-130815)
- Bomba de Perfusión (Portable Master Flex, L/S Sampling Pump, Cole-Parmer instrument company)

- Cryostato (Leica mod. cm 1510-3)
- UV Transilluminator (Uplan Ca. Mod. M-15)
- Agitador (Hoeter Pharmacia Biotech, mod. PR70-115V)
- Centrifuga (Ependorf, mod. 5415-C)
- Horno (Thermolyne, mod. 17600)
- Fuente de Poder (Fisher Biothech, mod. FD300)
- Horno para RT/PCR (Techne-Genius mod. FGENO5TP)
- Ultracentrifuga (Sorvall, mod. Super T21)
- Juego de Cámaras para electroforesis (Bio-Rad)
- Microscopio (Olympus, mod. BX41)
- Cámara para microscopio (Evolution VF color, mod 32-0104B-109)

6.3 Fármacos

Los fármacos que utilizamos fueron los siguientes:

- Araquidoniletanolamida, Anandamida. Canabinoide endógeno. Se obtuvo de Sigma-Aldrich Inc. La anandamida fue administrada bilateralmente al hipocampo o al estriado dorsolateral en tres diferentes dosis, 0.5µg, 1µg y 2µg por lado.
- 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida, AM251. Antagonista selectivo del CB1. Se obtuvo de Cayman Chemical Inc. Am251 fue administrado bilateralmente al hipocampo y al estriado en una dosis de 1.6µg por lado. Esta dosis fue elegida por ser equimolar a la dosis de 1µg de Anandamida para el experimento en el laberinto de Barnes. Para el experimento en el laberinto en T se realizaron tres dosis 0.4µg, 1.6µg y 3.2µg por lado.
- Los fármacos fueron administrados en un vehículo formado por DMSO 30%, Tween 0.2% en PBS.
- Los fármacos fueron administrados en los experimentos de conducta solos o en combinación siempre en un volumen de 1µl por lado y a un ritmo de administración de 0.2µl por minuto. Al finalizar los 5 minutos de

administración se dejaban los inyectores por un minuto y después eran retirados.

6.4 Cirugía

La cirugía se practicó en los sujetos que serian utilizados en las pruebas conductuales. Los sujetos fueron implantados estereotáxicamente con cánulas (23G) bajo anestesia inducida por el siguiente cocktail: Ketamina 66mg/kg, Xilazina 0.26mg/kg, acepromazina 1.3mg/kg. Las cánulas eran dirigidas a ambos hipocampos o ambos estriados, las coordenadas fueron: Hipocampo (CA1) P=4, L=2.5, V=2.2 y Estriado (dorsolateral) A=0.2, L=3.5, V=3.0). El inyector sobresalía 1mm a partir de la punta de la cánula guía. Se colocaron 3 tornillos de acero inoxidable en el cráneo de las ratas como soporte para el implante. Después de los experimentos los cerebros de las ratas fueron extraídos después de haber sido perfundidas transcárdicamente y fueron preparados para análisis histológico, mediante la técnica de violeta de cresilo y así confirmar la posición de la cánula. En la figura 6.1 podemos observar un esquema combinado con una micrografía con el sitio de administración para el hipocampo y el estriado.

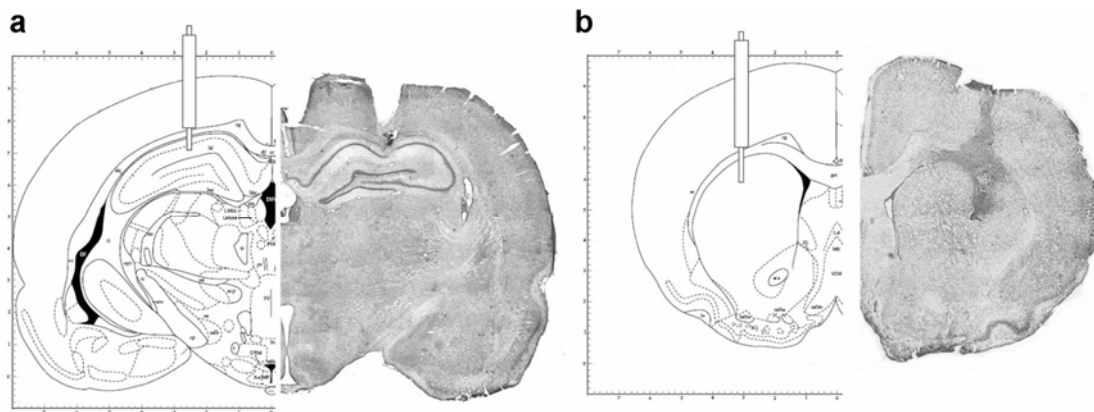


Figura 6.1 Sitios de administración en el hipocampo (a) y el estriado dorsolateral (b). Las micrografías son cortes representativos de los sujetos utilizados en este experimento.

6.5 Procedimientos

1. Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes fue descrito en 1979 por Barnes y col (1979). El diseño hemos utilizado para este proyecto tiene pequeñas adecuaciones en comparación al original. El laberinto esta formado por una plataforma circular de 120cm de diámetro. 40 agujeros de 6cm de diámetro separados equidistantemente uno del otro se encuentran distribuidos en la periferia de la plataforma. La plataforma se encuentra elevada a 90cm de suelo y esta ubicada al centro de una cámara de registro de 5m x 5m. En las paredes de la cámara de registro se encuentran colgadas diversas pinturas y objetos que sirven como claves espaciales. Adicionalmente, se utiliza una cámara cilíndrica de 20cm de diámetro por 40cm de altura. Una cámara rectangular de 25x8x10 se utiliza como túnel de escape y esta puede ser fijada por debajo de cualquiera de los agujeros del laberinto. En la figura 6.2 puede observarse una ilustración del laberinto de Barnes y sus distintos elementos. También utilizamos un aparato productor de ruido blanco como estímulo aversivo durante todos los experimento.

Durante los experimentos las luces de la cámara de registro se mantuvieron encendidas todo el tiempo, sin importar la fase de ciclo en la que eran entrenados (ver detalles en procedimiento). Se utilizó agua con cloro (5%) todos los días del entrenamiento para limpiar la cámara de registro, el laberinto de Barnes, el túnel de salida y el túnel de escape. Esto se hizo con la finalidad de mantener un aroma neutro durante los experimentos y evitar que los aromas propios del sujeto pudieran servir como alguna clave para los sujetos.

Utilizamos una videocámara estándar, una televisión y una videograbadora para registrar todos los experimentos conductuales y poder hacer análisis posteriores.

Procedimiento en el laberinto de Barnes

Entrenamos a los sujetos durante cinco sesiones consecutivas (una sesión por día, cinco días en total), en cada sesión los sujetos realizaban cuatro ensayos consecutivos. Cada ensayo tenia una duración máxima de

cuatro minutos y había un tiempo entre ensayos de 2 minutos. En total, cada sesión tenía una duración máxima aproximada de 24 minutos. Pero esto nunca ocurrió ya que nunca hubo algún sujeto que utilizara los cuatro minutos en los cuatro ensayos de una misma sesión. Además, conforme el entrenamiento avanzaba, los sujetos eran más rápidos en resolver el laberinto. En la figura 6.3 puede observarse un esquema general del entrenamiento para una rata.

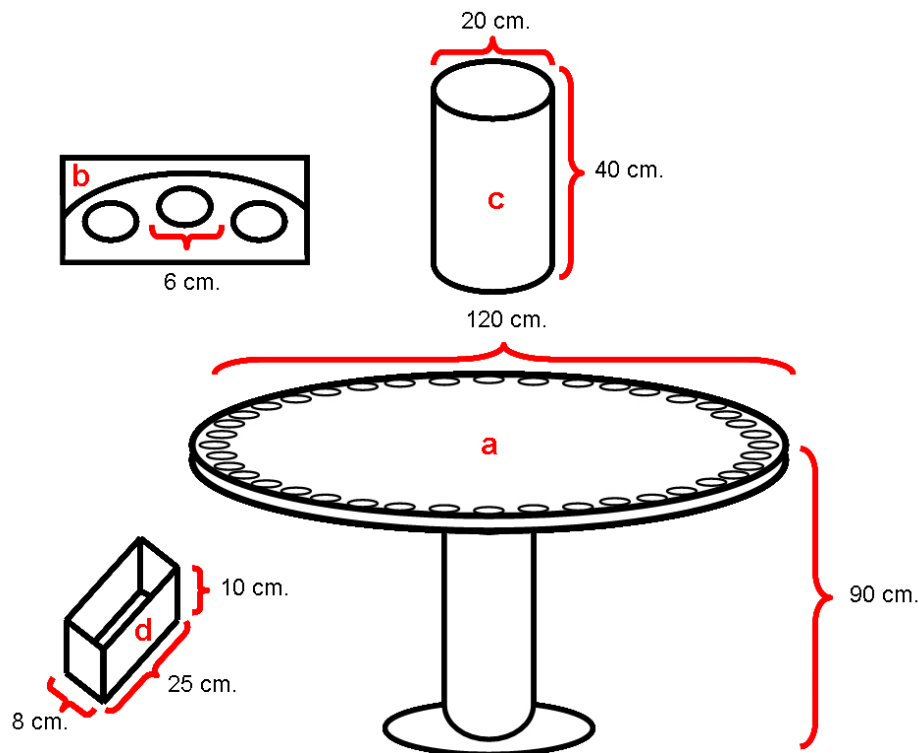


Figura 6.2. *Laberinto de Barnes.* (a) Laberinto de Barnes, (b) Acercamiento a uno de los agujeros de escape, (c) cámara cilíndrica de inicio, (d) túnel de escape.

La primera sesión de entrenamiento comenzaba colocando a la rata en el túnel de escape durante un minuto (minuto de habituación), al concluir este minuto la rata era colocada en su jaula habitación durante un minuto. Después de este minuto, la rata era colocada en la cámara cilíndrica en el centro del laberinto durante 10 segundos, después era liberada y se le permitía explorar el laberinto hasta por cuatro minutos en busca del túnel de escape. El ensayo se daba por concluido cuando la rata encontraba el túnel de escape o los cuatro minutos terminaban. Al inicio de los 10 segundos en la cámara cilíndrica, se encendía un ruido blanco a 90dB y este permanecía encendido durante todo el ensayo hasta que el sujeto encontraba el túnel de escape o bien terminaban

los 4 minutos. Este ruido servía como estímulo aversivo y su finalización era contingente con encontrar el túnel de escape. Durante los primeros dos ensayos de la primera sesión si los sujetos no lograban encontrar el túnel de escape en los cuatro minutos, eran conducidos gentilmente hasta el, ahí se permitía que las ratas entraran libremente al túnel y el ruido blanco era apagado. Después de estos ensayos si los sujetos no encontraban el túnel, eran retirados gentilmente del laberinto, y llevados hasta sus cajas donde permanecían un minuto.

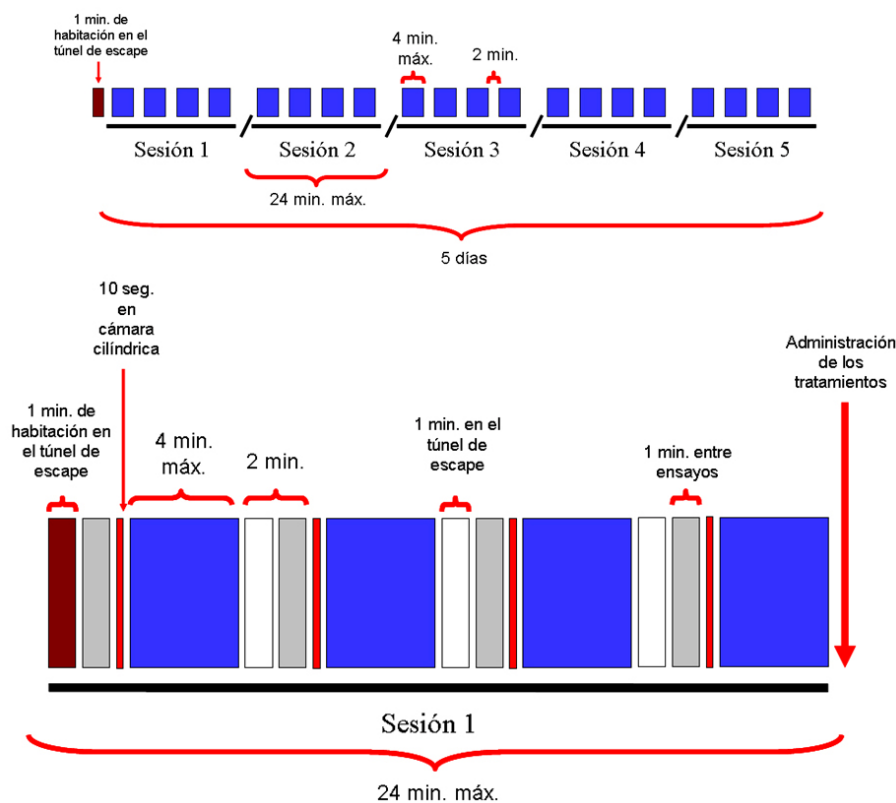


Figura 6.3 Esquema de entrenamiento. Se esquematizan las cinco sesiones de entrenamiento, y los tiempos de duración.

En la modalidad de entrenamiento que utilizamos en esta prueba, el objetivo era que los sujetos encontraran el túnel de escape, que se colocó en una posición específica con respecto a la cámara de registro y permaneció así durante todo el entrenamiento para cada rata. La posición del túnel para cada rata fue establecida aleatoriamente, en una de ocho posiciones (N, S, E, O, NE, SE, NO, SO) (Figura 6.4). En cada ensayo, el laberinto era rotado sobre su propio eje y limpiado perfectamente con la solución clorada. Esto con el objetivo de evitar que los sujetos pudieran encontrar otro tipo de claves que no

fueran las espaciales. , Haremos hincapié en que el túnel de escape permaneció en la misma posición espacial para cada rata, a pesar de que el laberinto fuera rotado.

Inmediatamente después de finalizar el último ensayo, las ratas eran administradas con cualquiera de los tratamientos farmacológicos. Con excepción del experimento de administración no contingente donde los sujetos fueron administrados dos horas después de haber concluido el último ensayo de cada sesión. Los tratamientos fueron administrados al final de las sesiones uno a cuatro. Administrar tratamientos al finalizar la sesión cinco no fue necesario puesto que no se evaluó ningún parámetro después de esta.

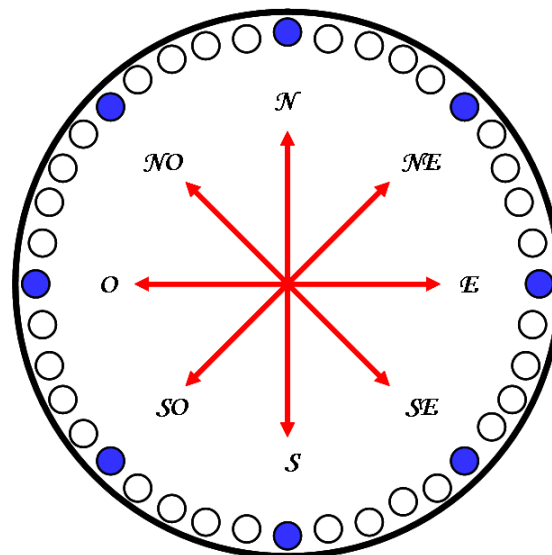


Figura 6.4 Esquema del Laberinto de Barnes. Se esquematizan las cinco 8 posiciones que se asignaron para los entrenamientos. La rosa de los vientos en el centro representa la posición del laberinto con respecto a la cámara de registro, cada uno de los círculos en la periferia representa uno de los cuarenta agujeros en el laberinto, y los círculos coloreados en azul representan las 8 posiciones utilizadas.

Evaluación del laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes es una prueba que nos permitió hacer una extensa evaluación de la conducta de los sujetos. En esta prueba pudimos evaluar el tiempo de ejecución, el número de errores cometidos, la distancia, el porcentaje de errores cometidos en alguna parte específica del laberinto y la estrategia

que los sujetos utilizaron para encontrar el túnel de escape. A continuación se explica cada uno de los parámetros.

Tiempo. El tiempo de ejecución o latencia para encontrar el túnel, comenzó a tomarse desde el momento en que el sujeto era liberado de la cámara cilíndrica y hasta que se introducía en el túnel de escape. En la sección de resultados se reporta en segundos y por lo tanto el tiempo máximo es de 240 segundos. La forma en que se agruparon los datos fue la siguiente: Los 4 ensayos por sesión de cada rata fueron promediados obteniendo un único valor de tiempo por sesión, se reportan los promedios de los tiempos por cada sesión.

Errores. Se consideró un error cuando el sujeto exploraba un agujero en el cual no se encontraba el túnel de escape. No existe límite en el número de errores que puede cometerse en cada ensayo, se contabilizan desde el primer agujero que la rata explora hasta que encuentra el túnel. Al igual que en el caso del tiempo, se reportan los valores promedio por sesión.

Distancia. La distancia es el número de agujeros que se encuentran entre el túnel de escape y el primer agujero que la rata visita. Esta medida comienza a darnos una idea de la orientación de la rata. La distancia máxima que puede existir es 20 ya que el laberinto consta de 40 agujeros, así que para una posición dada del túnel de escape la distancia máxima será la totalmente opuesta a él. Por ejemplo, en la figura 6.5 a, si el túnel de escape se encuentra en agujero 1, la distancia máxima corresponde a la posición 20 (20 agujeros).

Porcentaje de errores. Esta medida fue obtenida tomando en cuenta la distancia y el número de errores que se cometieron en cada agujero visitado en un solo ensayo. Por ejemplo, si en un ensayo un sujeto cometía 10 errores en total, determinamos cuantos de esos errores se cometieron a un agujero de distancia, a dos agujeros de distancia a 3 hasta 20, y después obtuvimos el porcentaje del total de los errores para cada distancia. Esta medida nos permitió saber precisamente en que lugar del laberinto preferían explorar los sujetos, esto es, cerca o lejos del túnel de escape.

Estrategias. De acuerdo con la literatura (Harrison et al, 2006) el laberinto de Barnes puede resolverse utilizando diferentes estrategias. Las que se han definido hasta el momento son la estrategia espacial, estrategia serial o secuencial y la estrategia aleatoria. *Estrategia espacial.* Nosotros consideramos un ensayo como espacial cuando el sujeto se dirigía en primera instancia hacia el túnel de escape o hasta 2 agujeros a ambos lados el, para un total de 5 agujeros. Hemos denominado a esta la “zona-blanco” (Figura 6.5 b). Dentro de la zona-blanco el sujeto podía cometer un número indeterminado de errores, y el ensayo aun era considerado como espacial. Sin embargo, si el sujeto exploraba fuera de esta zona, el ensayo era considerado aleatorio o secuencial. *Estrategia Serial.* Para que un ensayo fuera considerado como serial, las ratas podían ir a cualquier distancia en el laberinto. Sin embargo, tenían que explorar los agujeros en un orden secuencial (uno después del inmediato anterior) y en una sola dirección, hasta encontrar el túnel de escape. (Figura 6.5 c). *Estrategia Aleatoria.* Cualquier otra forma de exploración que no cumplió con los criterios de espacial o serial fue considerada como aleatoria (Figura 6.5 d).

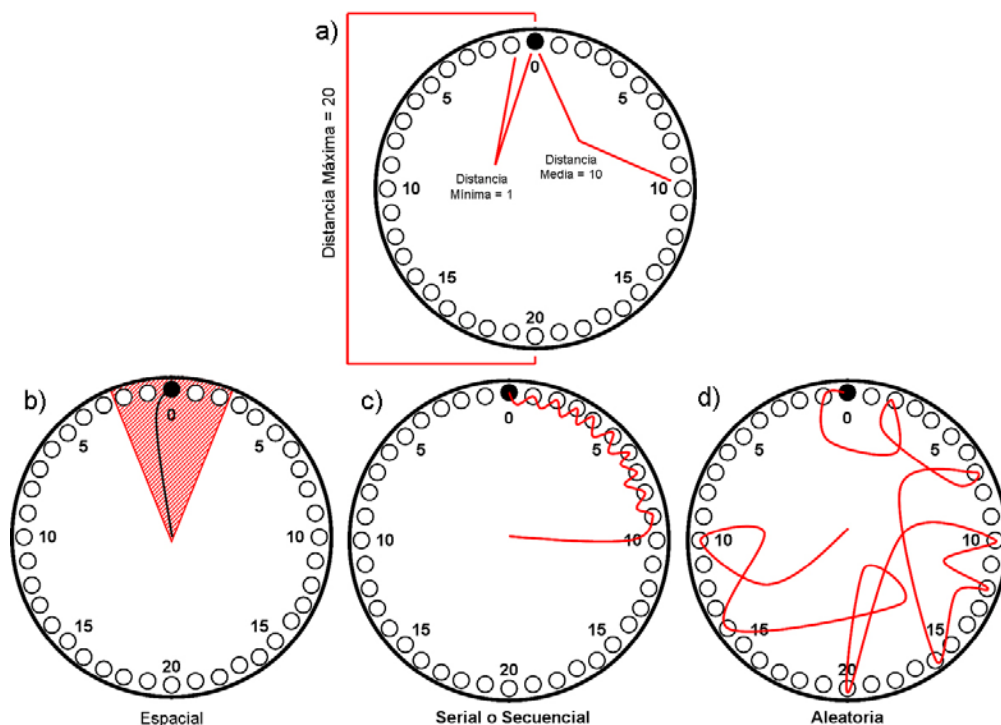


Figura 6.5 Esquema de la distancia y las estrategias en el Laberinto de Barnes. (a) Se esquematizan las distancias máxima (20), mínima (1) y media (10) de las 20 posibles. (b) Esquema de la estrategia espacial, la “zona-blanco se representa en rojo, la línea negra

esquematisa la trayectoria de una rata ejecutando estrategia espacial. (c) Esquema de la estrategia secuencial la línea roja esquematiza la trayectoria de una rata ejecutando estrategia secuencial. (d) esquema de la estrategia aleatoria la línea roja esquematiza la trayectoria de una rata ejecutando estrategia aleatoria.

Tomando en cuenta todos los parámetros antes mencionados se puede tener un estimado confiable de la conducta de la rata en el laberinto, así como de la estrategia que esta utilizando.

2. Laberinto en cruz

En este caso utilizamos una versión modificada del clásico laberinto en “T” conocida como “laberinto en cruz” (LC), esta versión es similar a la reportada por varios grupos de investigación con diferencias mínimas en cm (Packard y McGaugh 1996; Chang y Gold 2003; McIntyre y col 2003; Oliveira y col, 1997) donde se describen dos tipos de estrategias relacionadas con el hipocampo y el estriado. La figura 6.6 muestra las medidas y la forma del LC.

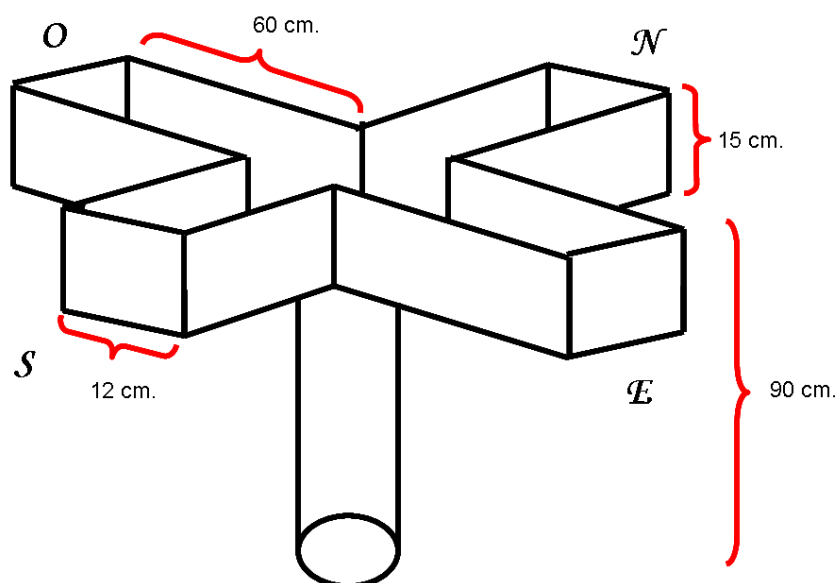


Figura 6.6 Esquema del laberinto en cruz. Medidas y distribución de los brazos.

Como se observa en la figura 6.6 el laberinto consiste de 4 brazos de 60cm de largo x 12cm de ancho y 15cm de alto cada uno. La parte central esta formada por un cuadrado de 20cm x 20cm. Al inicio de cada brazo, desde la parte central pueden colocarse puertas que permiten bloquear completamente

el acceso a cualquiera de los brazos, los últimos 20cm de cada brazo también pueden quedar aislados mediante la colocación de una puerta. Al final de los brazos, se encuentran fijos a las paredes, comederos donde se entregan los reforzadores. El laberinto esta elevado a 90 cm del suelo y se encuentra colocado al centro de una cámara de registro de 5m x 5m. Las paredes de la cámara de registro se encuentran diferenciadas mediante claves visuales como posters o cuadros. Se utilizó como reforzador, en todos los ensayos, una ración de 0.2g de arroz inflado con sabor a chocolate (Chococrispis, Kellogg's).

Al igual que en el laberinto de Barnes durante los experimentos las luces de la cámara de registro se mantuvieron encendidas todo el tiempo, sin importar la fase de ciclo en la que eran entrenados. Se utilizo agua con cloro (5%) todos los días del entrenamiento para limpiar la cámara de registro y el laberinto, con la finalidad de mantener un aroma constante durante los experimentos y evitar que esto pudiera servir como alguna clave para los sujetos.

Procedimiento en el laberinto en cruz

Todos los sujetos permanecieron privados de alimento al 85% de su peso durante todo el experimento. Tres días previos al inicio de la fase de habituación se registró el peso de los sujetos y se obtuvo un promedio, el 85% del peso se obtuvo con referencia a esta medición.

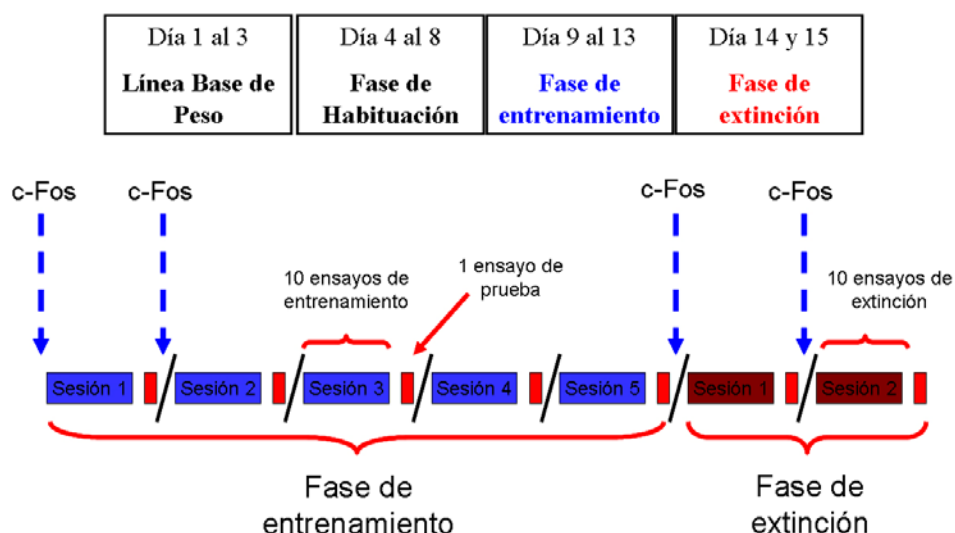


Figura 6.7 Esquema de entrenamiento en el laberinto en cruz. Duración de 15 días. Cada sesión de entrenamiento se realiza en un día, la

distancia entre sesiones es de 24 horas, lo mismo ocurre con las sesiones de extinción. Los ensayos de transferencia están marcados en los pequeños rectángulos rojos al final de cada sesión. Las flechas azules punteadas indican los momentos en el entrenamiento y extinción donde se sacrificaron ratas para la obtención de muestras e inmunohistoquímica contra c-Fos.

El esquema de entrenamiento puede observarse en la figura 6.7. Después de los tres días de línea base de peso, todos los sujetos fueron sometidos a una fase de habituación al laberinto durante 5 días (10 min. por día) previo al inicio del entrenamiento. En la habituación todos los brazos del laberinto permanecieron abiertos y se proporcionó el reforzador en todos los brazos al mismo tiempo (2 porciones por brazo, total 1.6g de reforzador) y se permitió a los sujetos explorar y alimentarse libremente durante los 10 minutos. Durante el primer día de habituación la mayoría de los sujetos no consumió el reforzador. Sin embargo, para el segundo día de entrenamiento todos los sujetos consumían al menos una porción del reforzador y para los días 3, 4 y 5 todos los sujetos consumían la totalidad de los reforzadores.

El noveno día del experimento comenzó la fase de entrenamiento y concluyó en el décimo tercer día. En el día décimo cuarto comenzó la fase de habituación y concluyó en el día décimo quinto.

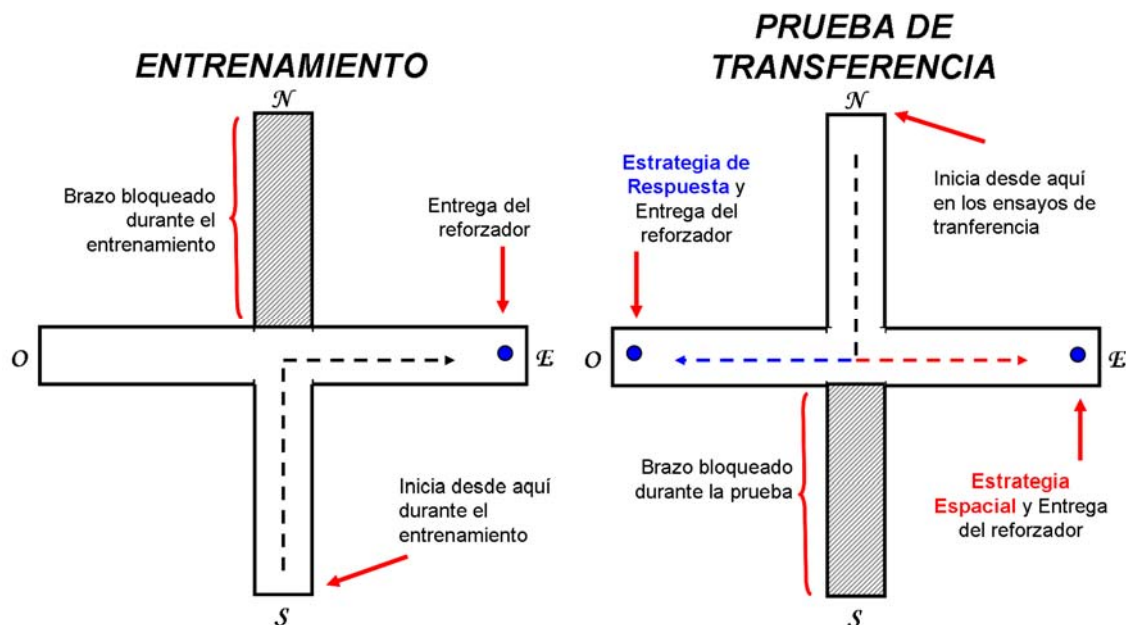


Figura 6.8 Esquema del entrenamiento y prueba de transferencia en el laberinto de cruz. Se indican los sitios de salida y reforzamiento. La flecha punteada en el entrenamiento indica la trayectoria hacia el reforzador. La flecha punteada roja en la prueba de transferencia

indica la trayectoria para considerar el ensayo como espacial mientras que la flecha azul indica la trayectoria para considerar al ensayo como de respuesta. El brazo gris es el brazo que fue bloqueado durante los ensayos.

El entrenamiento comienza eligiendo el brazo de salida para cada rata (el brazo de salida se elige al azar para cada rata y permanece así durante todo el entrenamiento, una de cuatro posiciones, N, S, E u O). El brazo opuesto al brazo de salida permanece bloqueado formando así un laberinto con forma de "T". El reforzador se coloca siempre en uno de los dos brazos restantes (en el ejemplo de la figura 6.8 la rata sale de "S" y el reforzador es entregado en "E").

Se realizan 10 ensayos y una prueba de transferencia por cada una de las 5 sesiones. Cada ensayo comienza con el sujeto restringido a los últimos 20cm dentro del brazo de salida durante 10 segundos, al concluir estos se abre la compuerta y se permite al sujeto explorar hasta por 2 min. para encontrar el reforzador. Si al término de estos dos minutos no lo ha encontrado se conduce al sujeto gentilmente hasta el brazo reforzado. Una vez que la rata ha encontrado el brazo reforzado o el experimentador lo ha llevado a él, se cierra la compuerta que restringe a los sujetos a los últimos 20cm del brazo reforzado y se le permite permanecer ahí durante 1 minuto, tiempo en el que el sujeto consume el reforzador. Al concluir este minuto se regresa al sujeto a su caja habitación y se limpia el laberinto con el agua clorada. Cuando los sujetos cometen un error (acudir al brazo no reforzado) se permite que el sujeto siga explorando hasta encontrar el brazo reforzado. Al término de los 10 ensayos de entrenamiento, se practica el la prueba de transferencia, en donde el sujeto sale del brazo opuesto al brazo de salida como se observa en la figura 6.8 (en el ejemplo, ahora el sujeto sale del brazo "N" y se bloquea el brazo "S" formando nuevamente la forma "T" del laberinto pero invertida) En este caso cuando el sujeto llega a cualquiera de los dos brazos se le confina y se le entrega el reforzador. Acudir al mismo brazo donde se le entregaba el reforzador (en nuestro ejemplo el brazo "E") se ha interpretado como que el sujeto se orienta con las claves espaciales externas al laberinto y calificamos ese ensayo como espacial. Si el sujeto va al brazo contrario al que se le reforzaba (en nuestro ejemplo "O") se interpreta como que el sujeto no utiliza las claves espaciales y utiliza como otro tipo de orientación, por ejemplo, siempre dar vuelta a la derecha, en este caso calificamos ese ensayo como "de

respuesta o secuencial". Los ensayos de transferencia se realizan al concluir los 10 ensayos por sesión, así al final de la fase de entrenamiento se tendrán cinco ensayos de transferencia.

3. Determinación del CB1

Sujetos: Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar entre 250 y 300 gramos. Los sujetos fueron mantenidos en condiciones de temperatura constante (23°C). Las condiciones de iluminación se mantuvieron constantes en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 donde las luces se encendían a las 8:00am. Un total de 90 ratas fueron sacrificadas mediante decapitación en los siguientes puntos del ciclo luz-oscuridad: 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00. Para determinar la proteína del CB1, se utilizaron 10 ratas por punto, mientras que para determinar el ARNm se utilizaron 5 ratas por punto. Adicionalmente se utilizaron 10 ratas que fueron perfundidas trans-cardíacamente, en dos puntos del ciclo, a las 13:00 y 01:00 con 5 ratas por punto.

Western Blot. Utilizamos esta técnica para detectar la cantidad de proteína del CB1 presente en nuestras muestras de hipocampo y estriado. El método de Western Blot (WB) supone la inmovilización de proteínas sobre membranas sintéticas seguido de la detección empleando sistemas especializados para la tinción de estas membranas. Para lograr el western blot nos basamos en el método utilizado por Martínez-Vargas y col (2003) y Navarro y col (2003).

Para obtener las muestras se sacrificaron 10 ratas en los 6 puntos del ciclo luz-oscuridad antes mencionados. Estas fueron decapitadas y sus hipocampos y estriados fueron extraídos en fresco. El tejido fue homogenizado con PBS e inhibidores de proteasas. Después, con el objetivo de obtener la fracción rica en membranas (el CB1 es una proteína membranal) estas muestras fueron centrifugadas a 600xg a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante resultante fue centrifugado a 39,000xg a 4°C por 15 minutos. El precipitado resultante fue resuspendido en la misma solución de PBS e inhibidores de proteasas y se le practicó una cuantificación de proteínas mediante el método de Lowry (Lowry y col, 1951).

Posteriormente, se realizó un ensayo de electroforesis en un gel analítico de SDS-poliacrilamida al 12% (gel de 0.75mm de grueso) como el descrito en Laemmli (1970). Para realizar este procedimiento se tomaron porciones del resuspendido equivalentes a 15µg de proteína y fueron mezclados con solución de Laemmli (Laemmli, 1970) y calentados a 95°C durante 5 minutos justo antes de cargar estas muestras en el gel. Las muestras fueron entonces sometidas a electroforesis a 150V durante 2 horas y después transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biothech, Buckinghamshire, UK) a 100 V durante 1 hora a 4°C.

Una vez que las proteínas fueron trasferidas a la membrana, esta fue incubada con una solución consistente de 3% de PBS-Tween, 10% leche sin grasa y 2% de suero normal de cabra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se agregó a esa solución el anticuerpo contra el CB1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) en una concentración de 1:1600 y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al concluir este proceso la membrana fue lavada con PBS-Tween (tres veces, 5 min. cada una) e incubada con el conjugado de anticuerpo contra conejo desarrollado en cabra de peroxidasa de rábano (goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase). La membrana fue revelada utilizando diaminobencidina (0.5 mg/kg en PBS + 0.3 µl/ml de H₂O₂ al 30%). Las membranas reveladas fueron fotografiadas y la densidad de las bandas fue analizada mediante el *"ImageJ software"* (National Instrument Health, USA).

Extracción de RNA. Para determinar la cantidad de mensajero del CB1 realizamos los siguientes pasos. La detección del ARNm del CB1 fue realizada mediante la extracción total de ARNm mediante la técnica de Trizol (Life Technologies, Rocville, MD, USA). Para esto se tomaron 100 mg de tejido (10mg de hipocampo, 100mg de estriado), fueron homogenizados con 1ml de solución de Trizol, se agregaron 200µl de cloroformo y se mezcló en vortex. Este homogenado fue centrifugado a 12,000xg durante 10 minutos. La fase acuosa resultante fue recuperada y se agregaron 5ml de isopropanolol y volvió a centrifugarse a 12,000xg durante 10 minutos para obtener la muestra final de ARNm. La integridad del ARN fue confirmada corriendo un gel de agarosa al 1%.

RT-PCR. Una vez obtenido el ARNm determinamos la cantidad de mensajero para CB1 mediante la técnica de Retro Transcripción –Reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR) (Life Technologies, Rockville, MD, USA). El ARN fue transcrito en reversa de la forma siguiente: 2µg del total de ARN fue incubado con DNAsas (libre de RNAasas), la concentración fue de 1 µl en 10µl de la solución buffer apropiada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó 1µl de ácido etilenediaminetetracético a 25mM y fue calentado a 65°C durante 10 minutos para detener la reacción. La mezcla resultante fue utilizada para la RT, se agregaron 25 µl del siguiente buffer a 2X (0.4mM de cada dNTP, 2.4mM de MgSO₄), 1 µl de la mezcla de transcriptasa reversa/polimerasa *thermus acuaticus* (RT/TAQ), MgCL₂, el primer antisentido del CB1 (5'atgctgtgtctagaggctg-3') en concentración de 10µM en 1µl y se agregó agua para ajustar a 50µl. La retrotranscripción fue realizada a 42°C durante 30 minutos y detenida mediante 5 minutos de calentamiento a 94°C.

La PCR fue realizada utilizando el primer sentido para el CB1 (5'-catcatcatccacacgtcag-3') y el primer antisentido para CB1 (5'-atgctgtgtctagaggctg-3') por 33 ciclos. Los ciclos fueron como sigue: desnaturalización 45s a 94°C, rezurcido 45s a 53°C y elongación 1min. a 72°C como en Martínez-Vargas (2003). Todos los ensayos fueron acompañados por muestras de ARN sin el paso de RT para excluir contaminación de ARN.

Inmunohistoquímica. Los cerebros de las ratas fueron extraídos después de haber sido perfundidas transcardialmente. Se tomaron muestras de ratas sacrificadas en dos puntos del ciclo luz-oscuridad (13:00, 01:00, 5 ratas por punto). Los cerebros fueron removidos y sumergidos en paraformaldehído al 4% durante la noche. Después el paraformaldehído fue sustituido por sucrosa al 18% por toda la noche y finalmente sucrosa al 30% durante toda la noche. Después se obtuvieron cortes coronales (50 µm) con ayuda de un criostato. Los cortes fueron colectados uno por cada 5 con referencia al atlas de Paxinos y Watson (1986), en donde se incluyeron el hipocampo y el estriado dorsolateral. Los cortes fueron incubados a temperatura ambiente con 0.075% de H₂O₂ en PBS durante 20 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente los cortes fueron bloqueados en 5% de suero normal de cabra en PBS con 0.3% de Triton X-100(TPBS). Después de este proceso las

secciones fueron incubadas durante 48 h a 4°C con el anticuerpo contra CB1 (Santa Cruz, CA, USA; concentración 1:100 en TPBS). El pegado de los anticuerpos fue revelado utilizando método del complejo de peroxidasa avidina-biotina (Vector Laboratorios). Una vez revelados, los cortes fueron montados en portaobjetos, fueron fotografiados exactamente bajo los mismos parámetros de amplificación, iluminación y contraste. Finalmente el análisis de la inmunoreactividad fue realizado en la región dorsolateral del estriado y en la capa granular del GD y la capa piramidal del CA1 y CA3 hipocampal. Cada región fue referida a un área libre de células en la misma sección para referir la medición contra el ruido de fondo. (En el hipocampo se utilizó el stratum radiatum y en el estriado se utilizó el cuerpo calloso).

Para los ensayos inmunohistoquímicos contra c-Fos se utilizó el mismo procedimiento con la excepción de que el anticuerpo primario fue sustituido por un anticuerpo específico para c-Fos (Santa Cruz, CA, USA; concentración 1:1000 en TPBS). c-Fos es una proteína nuclear clásicamente utilizada como marcador de actividad. Su aparición es el resultado la activación del gen de activación temprana c-fos, que a su vez es el resultado de la activación de cascadas de segunda mensajería activadas por la actividad de las neuronas. Una vez sintetizada la proteína c-Fos, esta forma dímeros con c-Jun que se conocen como AP-1, este complejo funciona como un factor de la transcripción para otros genes que pueden estar implicados con procesos plásticos. Para una revisión de c-Fos ver Morgan y Curran (1989).

7. Resultados

7.1 Experimento 1

1. Entrenar a ratas en dos puntos del ciclo luz-oscuridad (13:00 y 01:00) en el laberinto de Barnes para mostrar que existe una variación diurna en la expresión de estrategias.

Grupos control. Los grupos control fueron entrenados a las 13:00 y 01:00 hrs., bajo la administración intrahipocampal e intraestriatal del vehículo mencionado en la sección de métodos. Se utilizó una ANOVA de 2 vías para el análisis del tiempo (factor 1-grupo X factor 2-sesión). Como se observa en la figura 7.1, la comparación de los tiempos de ejecución no varía significativamente entre los grupos entrenados en luz u oscuridad. Sin embargo, en todos los grupos analizados hubo diferencias significativas entre las diferentes sesiones, reflejando una curva de aprendizaje. Todos los grupos mostraron diferencias significativas entre la sesión uno y las sesiones 2, 3, 4 y 5 ($p < 0.001$ para todos los grupos), también mostraron diferencias entre la sesión 2 y las sesiones 3, 4 y 5 ($p < 0.001$ para todos los grupos) y ninguno de los grupos mostró diferencias significativas entre la sesión 3 y 4 contra la sesión 4 y 5. Es importante remarcar la importancia de la similitud en los tiempos para resolver la tarea, estos sujetos muestran la misma eficiencia para resolver el laberinto en la fase de luz como en la fase de oscuridad.

Los errores cometidos están aumentados en los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad. Este efecto es mucho más evidente para los sujetos entrenados bajo la administración intra-estriatal.

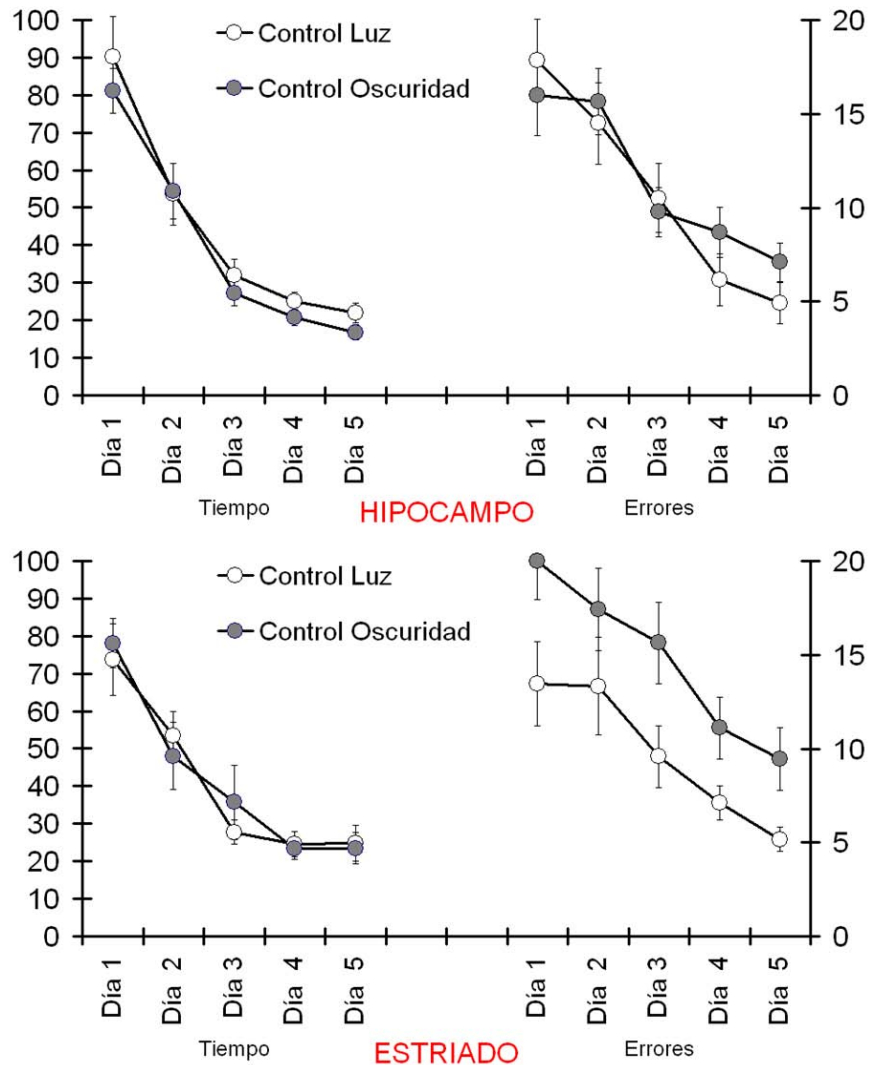


Figura 7.1 Tiempos de ejecución (datos a la izquierda) y errores (datos a la derecha) para los sujetos entrenados bajo administración de vehículo en el hipocampo (**panel superior**) y estriado (**panel inferior**) durante la fase de luz (círculos abiertos) y durante la fase de oscuridad (círculos cerrados).

Después de analizar los datos correspondientes al tiempo y errores, decidimos analizar la distancia y el porcentaje de errores cometidos en cada parte del laberinto. Para analizar la distancia entre los grupos control de luz y oscuridad, utilizamos una prueba de rangos de Mann-Whitney. Como lo muestra la figura 7.2 (panel izquierdo) los sujetos entrenados durante la fase de luz acudieron en su primer error, es decir en su primera aproximación, a una

distancia de 2 con respecto al túnel de escape; mientras que los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad acudieron a una distancia de 7. Esto ocurrió tanto para los controles de hipocampo ($p < 0.001$) como para los de estriado ($p = 0.049$). Para el análisis de la distribución de los errores (Fig. 7.2 panel derecho) utilizamos una ANOVA de una vía. Los sujetos entrenados en la fase de luz mostraron un porcentaje significativamente mayor de exploración en la “zona espacial” que los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad; tanto para los grupos con implantes hipocampales ($p < 0.001$) como para los grupos con implantes estriatales ($p < 0.05$). Tomando estos datos en conjunto, podemos decir que los sujetos entrenados en la luz preferían acudir directamente a la zona espacial y además preferían explorar en ella; mientras que los sujetos entrenados en la oscuridad distribuían la exploración en todo el laberinto sin mostrar predilección por la zona espacial. El análisis de las distancias y porcentaje de errores se llevo a cabo en los datos obtenidos en las sesiones 4 y 5 correspondientes a los ensayos 13 a 20. En esta fase del entrenamiento los sujetos resolvían el laberinto en los mismos tiempos, mostrando un nivel de eficiencia similar, como lo indican los tiempos de ejecución, en donde no se encontraron diferencias entre la sesión 4 y 5 en ninguno de los grupos (Fig. 7.1). Las diferencias entre los grupos de luz y oscuridad se deben por lo tanto a la forma de resolver la tarea más que a la eficiencia en la misma.

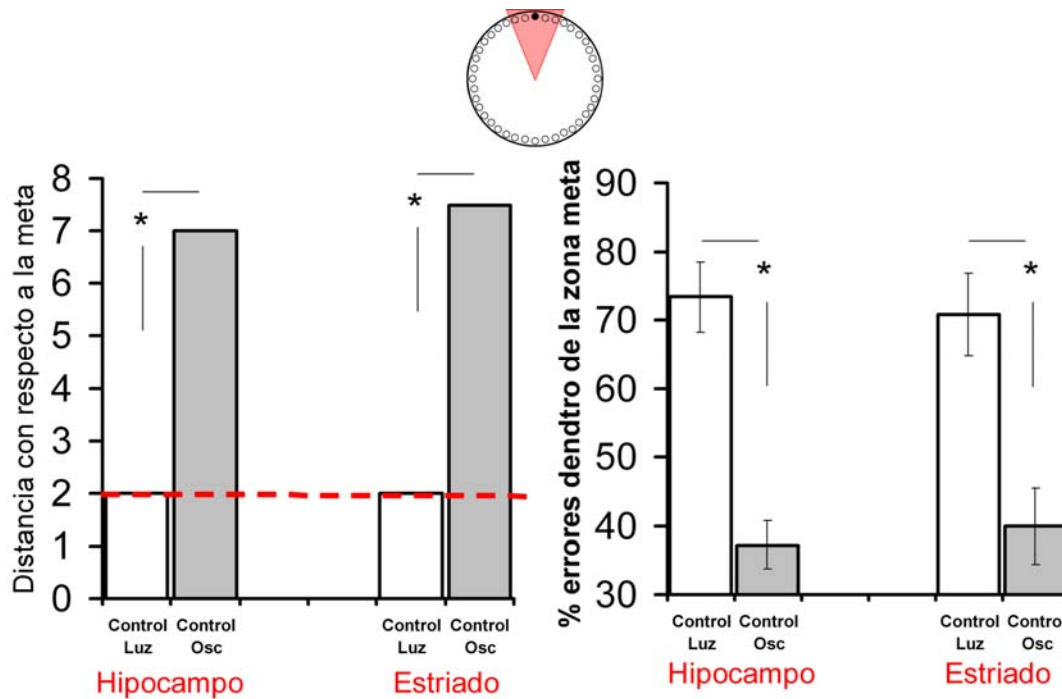


Figura 7.2 Distancia (**panel izquierdo**) y distribución de los errores (**panel derecho**) para los sujetos entrenados bajo administración de vehículo en el hipocampo y estriado durante la fase de luz (**barras abiertas**) y durante la fase de oscuridad (**barras cerradas**). Obsérvese como en todos los casos los sujetos entrenados en la fase de luz acudían preferencialmente a la zona espacial (marcada en rojo en la figura superior) y además cometían la mayor cantidad de errores en ella. Los datos de distancia están expresados como la mediana de la distancia mientras que los datos de la distribución de los errores están expresados como la media + error estándar del porcentaje de errores dentro de la zona espacial (2 agujeros a ambos lados del agujero meta).

Consistentemente con estos datos, podemos observar que el último parámetro que tomamos en cuenta, la estrategia utilizada para resolver la tarea, es diferente dependiendo de la fase del ciclo en la que se entrene a los sujetos. Así los sujetos entrenados durante la fase de luz, tanto para el grupo hipocampal como estriatal, expresaron una mayor cantidad de estrategia espacial; mientras que los sujetos entrenados durante la oscuridad expresaron un mayor porcentaje de estrategia serial (Fig. 7.3).

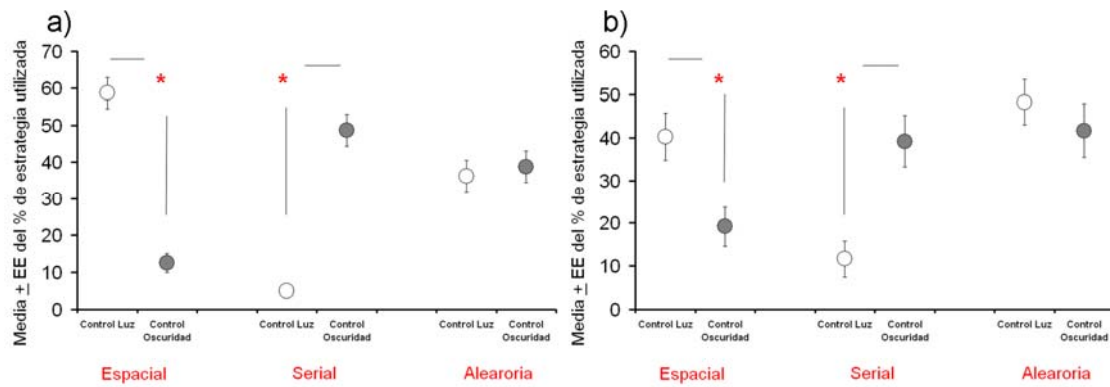


Figura 7.3 Estrategia utilizada para resolver el laberinto de Barnes para los sujetos con implantes hipocámpales (**a**) y con implantes estriatales (**b**) durante la fase de luz (**círculos abiertos**) y durante la fase de oscuridad (**círculos cerrados**). Observe como durante la fase de luz los sujetos expresan significativamente un mayor porcentaje de estrategia espacial que durante la oscuridad y un mayor porcentaje de estrategia serial durante la oscuridad.

La expresión de estrategia espacial es sustentada por la alta exploración dentro de la zona espacial, así como la distancia menor a dos, que se observa en los sujetos entrenados durante la fase de luz (Fig. 7.2). Del mismo modo, el bajo nivel de exploración en la zona espacial, y las distancias mostradas por los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad sustentan la presencia de estrategia serial. Estos datos replican y confirman nuestras previas observaciones y muestran que la administración del vehículo directamente en el hipocampo y el estriado no afecta la expresión de las estrategias. **Podemos concluir que los sujetos entrenados en el laberinto de Barnes durante la fase de luz resuelven la tarea de manera preferentemente espacial; mientras que los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad lo hacen de manera serial.**

2. Administrar ANA y un antagonista del CB1 (AM251) en el hipocampo y el estriado y valorar sus efectos en la ejecución en el laberinto de Barnes en ambas fases del ciclo luz-oscuridad.

Administración Intrahipocampal de Anandamida y Am251. Anandamida fue administrada en siguiendo una curva dosis respuesta, los datos se despliegan en la figura 7.4. Con respecto al tiempo de ejecución, ninguna de las diferentes dosis de anandamida produjo cambios significativos con respecto al control en ninguna de las dos fases del ciclo (Fig. 7.4 a). La cantidad de errores tampoco fue diferente entre los grupos (Fig. 7.4 b). Sin embargo, cuando analizamos la distancia así como la distribución de los errores pudo observarse que los sujetos entrenados en la fase de luz bajo la administración de 1 μg y 2 μg de ANA, presentaron distancias significativamente mas largas (ANA1 μg y ANA2 μg vs Cont $p < 0.05$) y porcentajes de exploración en la zona espacial significativamente menores (ANA1 μg vs Cont $p < 0.021$; ANA2 μg vs Cont $p < 0.011$) al grupo control. El grupo con la administración de 0.5 μg de ANA no mostró diferencias contra el control en ninguno de los parámetros. En la misma fase de luz, los sujetos entrenados bajo el tratamiento de ANA1 μg y ANA2 μg disminuyeron significativamente la expresión de la estrategia espacial con respecto al control ($p < 0.05$ en ambos casos). Además, el grupo ANA1 μg mostró un incremento significativo en la conducta aleatoria ($p < 0.05$).

Es importante mencionar que durante la fase de oscuridad ninguna de las administraciones de ANA en el hipocampo causó efectos en ninguna de las variables medidas. Este resultado sugiere una participación diferencial del sistema canabinérgico en el hipocampo en relación con esta tarea dependiendo

del ciclo luz-oscuridad. Debe notarse que los grupos control expresan la estrategia serial durante la fase de oscuridad. Esto sugiere que la participación del hipocampo es diferente en la solución de esta tarea dependiendo la fase del ciclo donde se entrena a los sujetos. Esta hipótesis es fortalecida por el hecho de que la administración de agonistas canabinérgicos en el hipocampo presenta efectos dependientes del ciclo.

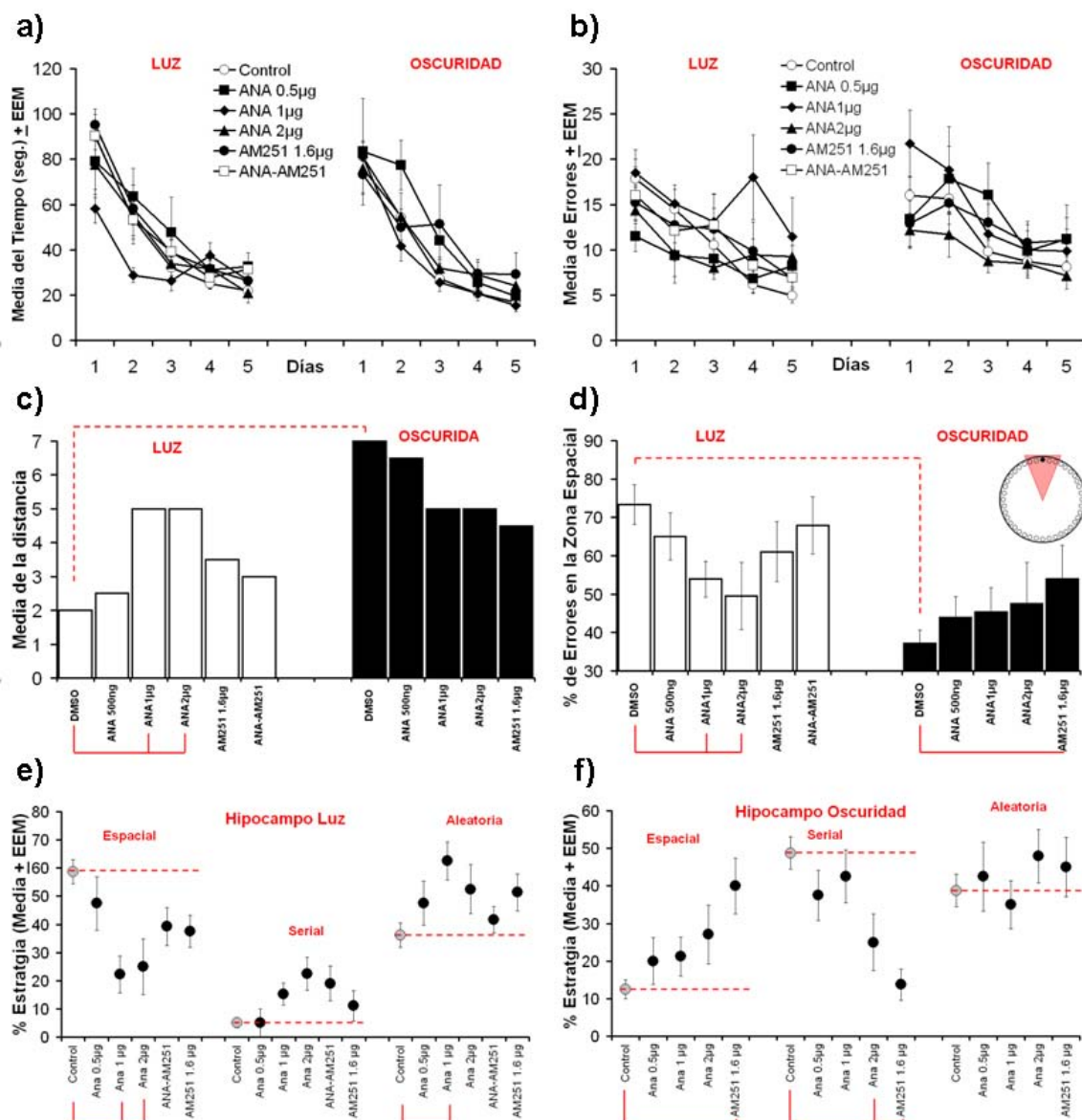


Figura 7.4 Resultados en el laberinto de Barnes para los sujetos con tratamientos en el hipocampo. (a) Tiempos de ejecución durante la fase de luz (lado izquierdo) y oscuridad (lado derecho). (b) Errores durante la fase de luz (lado izquierdo) y oscuridad (lado derecho). (c) Distancia para los sujetos entrenados durante la luz (barras

blancas) y oscuridad (**barras negras**). (d) Porcentaje de errores cometidos en la zona espacial (zona roja en el laberinto de Barnes inserto) para los sujetos entrenados durante la fase de luz (**barras blancas**) y oscuridad (**barras negras**). Se despliegan las estrategias utilizadas por los sujetos entrenados durante la fase de luz (e) y oscuridad (f). Los grupos control están representados en un círculo gris mientras que los tratamientos se presentan en círculos negros, la línea punteada roja representa el nivel del grupo control agregada para apreciar mejor las diferencias con los grupos experimentales. (En c, d, f y g las diferencias estadísticamente significativas se presentan con líneas rojas uniendo los rótulos de los grupos en cuestión, en c y d las líneas punteadas rojas indican las diferencias significativas entre los grupos control en la luz y la oscuridad).

Los efectos provocados por la administración de ANA durante la fase de luz fueron bloqueados mediante la administración del antagonista selectivo para el CB1, el AM251, Este efecto se observa en los parámetros de distancia, distribución de errores y estrategia (Fig. 7.4 c, d, e) en donde la administración combinada de AM251 y ANA1 μ g no son significativamente diferentes al control. Estos datos indican que los efectos inducidos por ANA son mediados a través del CB1, implicándolo así en la modulación de la memoria en el hipocampo.

Otro dato que fortalece nuestra hipótesis es el que surge de la administración única del AM251 en ambas fases del ciclo. Durante la fase de luz no se observan efectos relacionados con el AM251. Sin embargo, durante la fase de oscuridad puede observarse un incremento significativo de la exploración dentro de la zona espacial así como un aumento significativo en la estrategia espacial ($p < 0.05$). Esta conducta se despliega a costa de una disminución, también significativa, de la estrategia serial ($p < 0.05$) (Fig. 7.4 d, f). Este dato sugiere que en condiciones naturales durante la fase de oscuridad el hipocampo se encuentra inhibido por la activación del CB1 y por lo tanto, el bloqueo de este receptor en esta fase asemeja lo ocurrido durante la fase de luz, es decir, la expresión de estrategia espacial.

Administración Intraestriatal de Anandamida y AM251. En el caso del estriado, ANA también fue administrada en una curva dosis respuesta, en las mismas concentraciones utilizadas en el hipocampo. Los datos correspondientes al tiempo de ejecución o número de errores no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 7.5 a y b). Al contrario de la administración en el hipocampo durante la fase de luz, la administración de ANA, la combinación entre ANA y AM251 o el AM251 solo no evocaron ningún efecto significativo en la conducta.

Por otro lado, durante la fase de oscuridad pudo observarse que ANA1 μ g, ANA2 μ g, ANA-AM251 y AM251 provocaron los mismos efectos en la conducta: una disminución significativa de la estrategia serial ($p < 0.05$ en todos los casos). La estrategia espacial o aleatoria no se vio modificada por ninguno de los tratamientos (Fig. 7.5 c, d, e, f). Estos datos sugieren que tanto el bloqueo del CB1 como la activación anormal (mediante la administración exógena de altas dosis de agonistas) del mismo, producen efectos indeseables en la consolidación de la memoria relacionada con el estriado. El hecho de que estos efectos estén relegados a la fase oscura del ciclo, sustenta la hipótesis de que la actividad del estriado adquiere mayor importancia durante la fase de oscuridad, donde como vimos en la sección anterior, la sobre activación del CB1 en el hipocampo no tiene efectos, pero su bloqueo produce un incremento de la estrategia espacial. El hecho de que ambos tratamientos (activación y bloqueo del CB1) produzcan los mismos efectos conductuales sugiere que ANA podría actuar a través de diferentes mecanismos de acción del CB1. También sugiere que la activación del CB1 es necesaria para la consolidación

de la memoria en el estriado. Otras posibles explicaciones se discuten mas adelante.

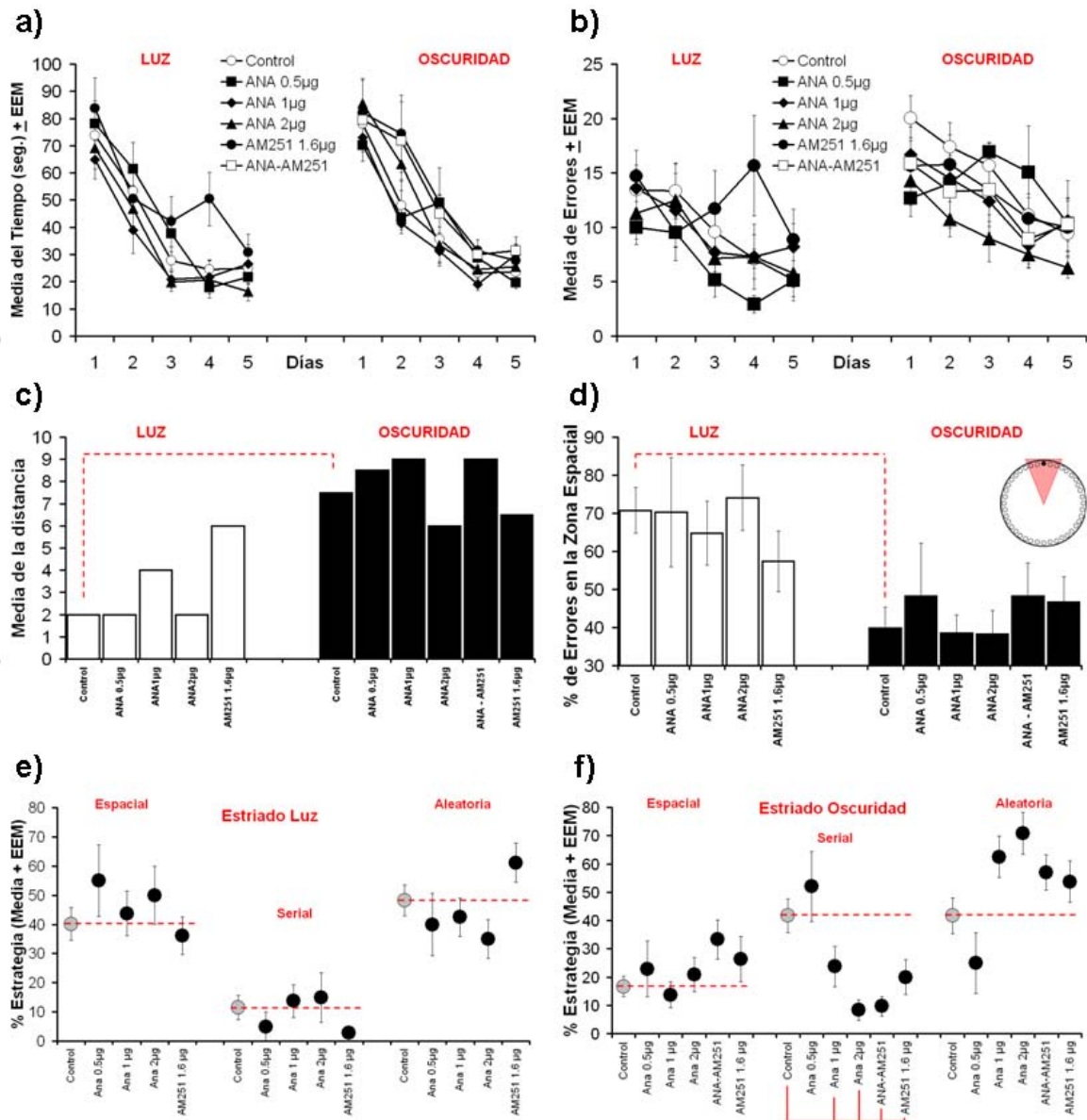


Figura 7.5 Resultados en el laberinto de Barnes para los sujetos con tratamientos en el estriado. (a) Tiempos de ejecución durante la fase de luz (**lado izquierdo**) y oscuridad (**lado derecho**). (b) Errores durante la fase de luz (**lado izquierdo**) y oscuridad (**lado derecho**). (c) Distancia para los sujetos entrenados durante la luz (barras blancas) y oscuridad (**barras negras**). (d) Porcentaje de errores cometidos en la zona espacial (zona roja en el laberinto de barnes inserto) para los sujetos entrenados durante la fase de luz (**barras blancas**) y oscuridad (**barras negras**). Se despliegan las estrategias utilizadas por los sujetos entrenados durante la fase de luz (e) y oscuridad (f). Los grupos control están representados en un círculo gris mientras que los tratamientos se presentan en círculos negros, la línea punteada roja representa el nivel del grupo control agregada para apreciar mejor las diferencias con los grupos experimentales. (En

c, d, f y g las diferencias estadísticamente significativas se presentan con líneas rojas uniendo los rótulos de los grupos en cuestión, en c y d las líneas punteadas rojas indican las diferencias significativas entre los grupos control en la luz y la oscuridad).

Administración no contingente intrahipocampal e intraestriatal de Anandamida. Los resultados presentados hasta el momento sugieren que los tratamientos de ANA y AM251 en el hipocampo y en el estriado en cualquiera de las fases en donde hayan tenido efectos, son debidos a la interferencia con algún mecanismo necesario para la consolidación de la memoria. Esto se infiere por el momento en que las drogas fueron administradas (inmediatamente después del último ensayo de cada sesión). Sin embargo, no se puede descartar que la administración de los fármacos produzca un efecto a largo plazo que afecte la evocación más que la consolidación de la memoria. Por ejemplo, la administración repetida de los tratamientos en el hipocampo o el estriado podría producir cierto daño a la funcionalidad de la estructura, de tal forma que la evocación de la tarea estaría inhibida sin que esto quisiera decir que la consolidación no tuvo lugar.

Por este motivo realizamos administraciones de ANA1 μ g en el hipocampo durante la fase de luz y en el estriado durante la fase de oscuridad, dos horas después de haber concluido el último ensayo de cada sesión. Esta administración fue considerada como no contingente a la consolidación de la memoria. Se ha sugerido que el proceso de consolidación de la memoria tiene una duración limitada y cercana al momento de la adquisición, un periodo de algunos minutos a horas (para revisión Lechner y col, 1999; McGaugh, 2000). Elegimos la dosis de ANA1 μ g por ser una dosis efectiva e intermedia en la curva dosis respuesta. Decidimos administrar en el hipocampo durante la fase

de luz y en el estriado en la fase de oscuridad por ser los momentos en que los tratamientos fueron eficientes en cada estructura.

Los resultados de estas administraciones muestran claramente que los efectos obtenidos en el experimento anterior, se deben a un deterioro en la consolidación de la memoria. Los sujetos entrenados en la fase de luz, bajo la administración intrahipocampal, dos horas después de la adquisición, no presentaron ningún deterioro en la evocación en ninguno de los parámetros cuantificados. Como se esperaba, este grupo no es significativamente diferente al grupo control pero si es significativamente diferente al grupo ANA1 μ g que fue administrado inmediatamente después de la adquisición, (distancia $p < 0.05$; errores en la zona espacial $p = 0.039$; estrategia espacial $p < 0.001$; estrategia aleatoria $p = 0.003$) (Figura 7.6).

Por otro lado, los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad, con la administración intraestriatal de ANA1 μ g dos horas después de la adquisición, tampoco mostraron diferencias en la evocación de las estrategias o en alguno de los otros parámetros cuando se les comparo contra el grupo control. Estos sujetos si fueron significativamente diferentes cuando se les comparo contra la administración de ANA1 μ g inmediatamente después de la adquisición. En este caso la estrategia serial no fue diferente contra el grupo control, pero si significativamente mayor que contra el grupo ANA1 μ g post-adquisición ($p = 0.47$).

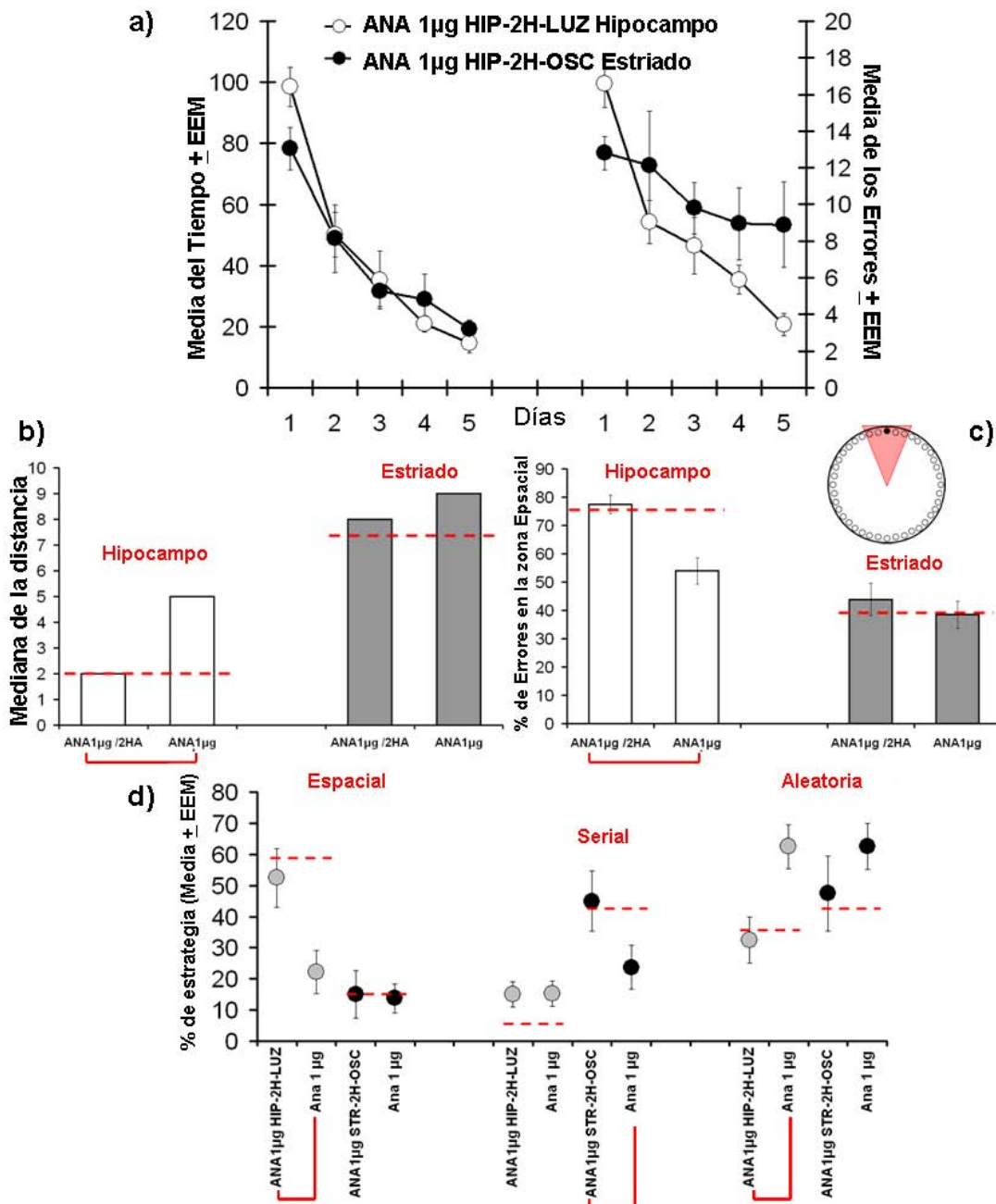


Figura 7.6 Resultados en el laberinto de Barnes para los sujetos con tratamientos en el hipocampo y estriado dos horas después de la adquisición. (a) Tiempos de ejecución (lado izquierdo) y errores (lado derecho) para los sujetos con administración intrahipocampal (círculos abiertos) e intraestriatal (círculos cerrados) dos horas después de la adquisición. Distancia (b) y porcentaje de exploración en la zona espacial (c) para los sujetos con administración intrahipocampal (barras blancas) e intraestriatal (barras grises) inmediatamente después de la adquisición (ANA1µg) y dos horas después de la adquisición (ANA1µg/2HA), las líneas punteadas rojas representan los valores medios del grupo control. (d) Porcentaje de estrategia expresado por los sujetos intrahipocampales durante la fase de luz (círculos claros) e intraestriatales durante la fase de oscuridad (círculos oscuros). En b, c y d las líneas punteadas rojas representan los valores medios del grupo control, las líneas rojas continuas representan las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos correspondientes.

3. Realizar la cuantificación de proteínas y ARNm en el hipocampo y el núcleo estriado durante el ciclo luz-oscuridad.

Para realizar estas cuantificaciones utilizamos tres técnicas distintas explicadas en la sección de método. El western blot para cuantificar la proteína total del CB1, el RT/PCR para cuantificar el ARNm del CB1 y la técnica de inmunohistoquímica para cuantificar la cantidad de CB1 en una región específica.

Western Blot. Los resultados muestran una variación diurna en los niveles de la proteína CB1 en el hipocampo pero no así en el estriado. En el hipocampo los niveles mas altos del receptor se encuentran a las 13:00hrs (fase de luz) mientras que los niveles mas bajos se encuentran a las 01:00hrs (fase de oscuridad). El análisis estadístico (ANOVA de una sola vía) nos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre varios puntos incluida la comparación entre las 13:00hrs y las 01:00hrs ($p < 0.001$) (13:00 vs 05:00 $p = 0.009$; 13:00 vs 21:00 $p = 0.036$). Los datos se despliegan en la figura 7.7.

RT/PCR. De forma muy similar a los resultados obtenidos para la proteína, el mensajero del CB1 varía a lo largo del ciclo luz oscuridad en el hipocampo, pero no en el estriado. En el hipocampo los niveles mas altos del mensajero se encuentran a las 21:00hrs (fase de oscuridad); mientras que los niveles mas bajos se encuentran a las 17:00hrs (fase de luz). El análisis estadístico (ANOVA de una sola vía) nos muestra que existen diferencias significativas entre varios puntos, incluida la comparación entre las 13:00hrs y las 01:00hrs

($p < 0.001$) (13:00 vs 05:00 $p = 0.009$; 13:00 vs 09:00 $p = 0.002$; 13:00 vs 21:00 $p < 0.001$; 01:00 vs 05:00 $p < 0.001$; 01:00 vs 09:00 $p < 0.001$; 01:00 vs 17:00 $p < 0.001$; 01:00 vs 21:00 $p = 0.031$). Los datos se despliegan en la figura 7.7. La comparación entre las 01:00 y 13:00 es relevante por ser el momento en el que se realizaron los experimentos conductuales.

Estos datos demuestran que el CB1 en el hipocampo es susceptible a las variaciones diurnas, mientras que el estriado permanece estable. En el caso del hipocampo existe una diferencia de aproximadamente 16 horas entre los puntos de mayor concentración de la proteína (13:00hrs) y el mensajero (21:00), lo que muestra que el mensajero se produce antes y la proteína va aumentando sus niveles hasta llegar a su máxima concentración a las 13 horas. Estos datos sustentan la idea de que el CB1 en el hipocampo puede modular la actividad de manera diferencial dependiendo del ciclo luz oscuridad. Sin embargo, como lo hemos visto en la sección del sistema canabinérgico, el CB1 en el hipocampo y el estriado se encuentra expresado tanto en células glutamatérgicas como GABAérgicas, lamentablemente con nuestras técnicas no es posible determinar si esta variación diurna es debida al CB1 en las células GABAérgicas, glutamatérgicas o en ambas.

Inmunohistoquímica. Mediante esta técnica pudimos observar diferentes regiones del hipocampo y del estriado. Las muestras se obtuvieron a las 01:00 y 13:00 y los análisis se realizaron en las regiones de CA1, CA3 y GD en el hipocampo y en el estriado dorsolateral, por ser las más relevantes para los estudios de memoria.

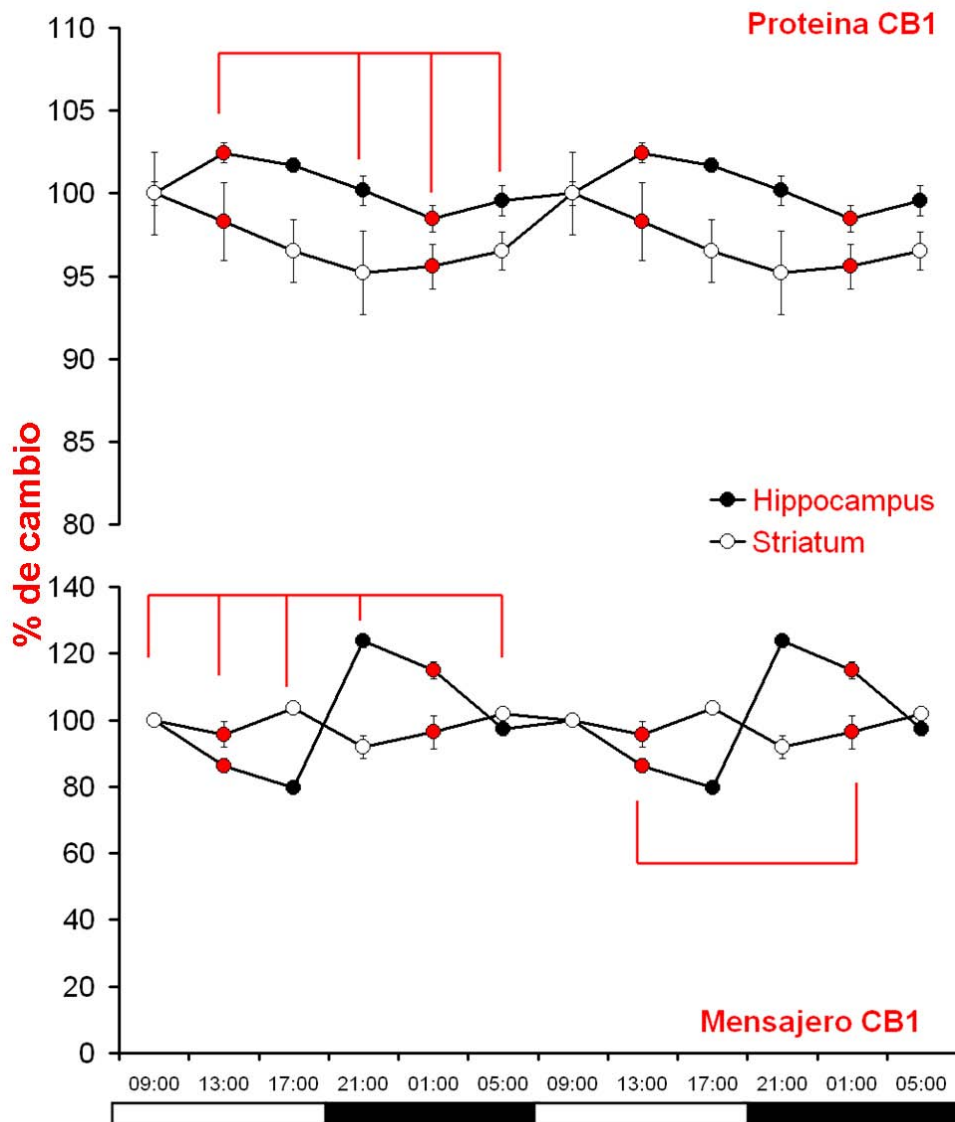


Figura 7.7 Expresión de la proteína CB1 (**panel superior**) y del mensajero para el CB1 (**panel inferior**) en 6 puntos del ciclo luz oscuridad en el hipocampo (círculos cerrados) y en el estriado (círculos abiertos). Los datos se despliegan como la media \pm el error estándar del porcentaje de cambio con respecto al punto de las 09:00hrs. Los puntos rojos en todas las curvas resaltan el momento en que se realizaron los experimentos conductuales en la fase de luz (13:00) y de oscuridad (01:00). Los datos están desplegados en una doble gráfica para poder apreciar mejor la variación diurna. Las barras blancas y negras en la parte inferior representan la fase de luz y oscuridad respectivamente. Las líneas rojas representan las diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados indican que en el hipocampo la región del GD fue la única que mostró diferencias significativas entre las 01:00 y las 13:00 ($p=0.002$). La región de CA1 y CA3 no mostraron diferencias significativas. Por otro lado, mediante esta técnica, el estriado mostró un cambio significativo, dependiendo

del ciclo luz-oscuridad, la mayor expresión del CB1 se dio a las 13:00hrs ($p=0.002$). Es posible que no hayamos encontrado una diferencia mediante la técnica de western blot o RT/PCR debido a la forma de tomar las muestras, en este caso pudimos dirigir el análisis específicamente a la región dorsolateral del estriado. Sin embargo, en las otras mediciones fue complicado disecar únicamente esta zona por lo que el análisis se realizó incluyendo otras regiones de los núcleos de la base como el globo pálido interno y externo que también presentan altas concentraciones del CB1. Estos datos son consistentes con los obtenidos en el western blot donde las mayores concentraciones del CB1 hipocamapal están a las 13:00hrs. (Fig. 7.8).

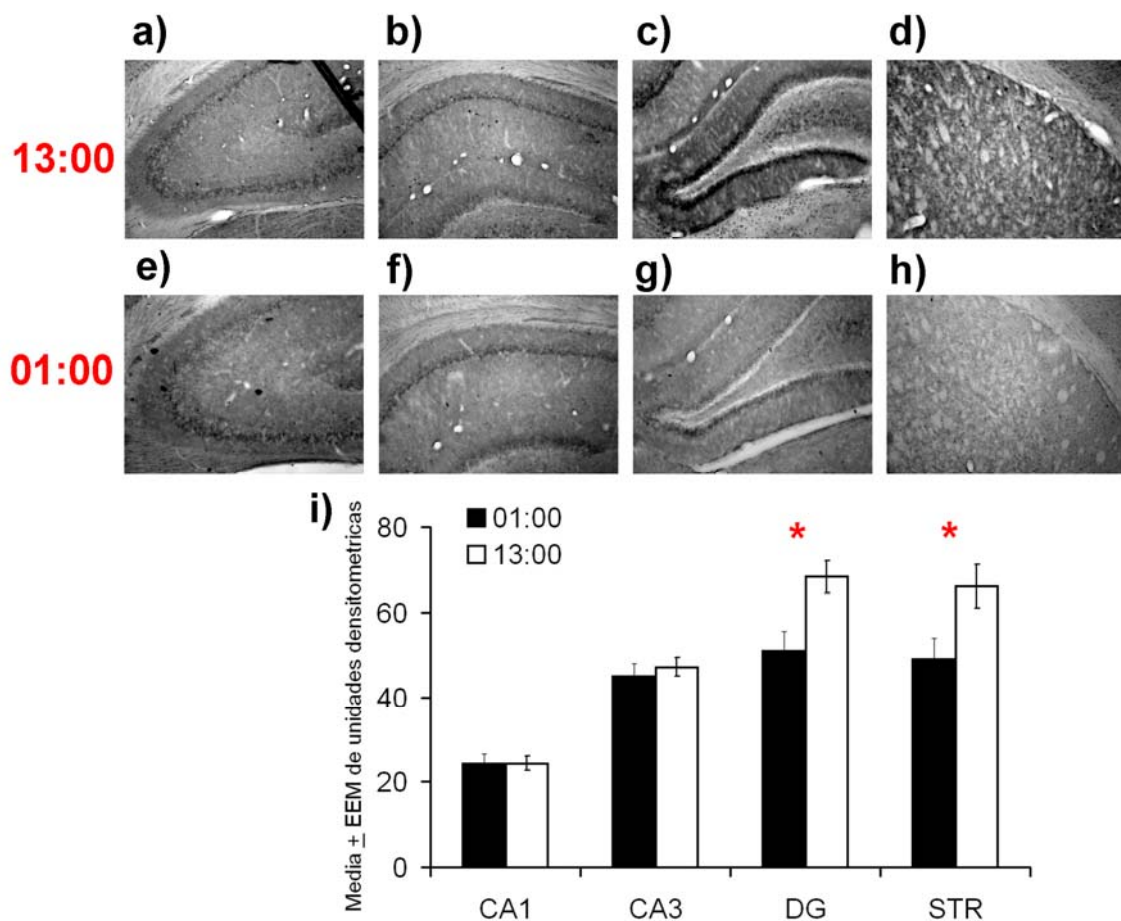


Figura 7.8 Inmunohistoquímica contra el CB1 en el hipocampo y el estriado. La región del CA1 (**micrografías a y e**) CA3 (**micrografías b y f**) no mostraron cambios entre los puntos de las 13:00hrs (**barras**

blancas en i) y las 01:00hrs (barras negras en i). Por otro lado las regiones del GD (micrografías c y g) y el estriado dorsolateral (micrografías d y h) mostraron diferencias significativas entre la 13:00hrs y 01:00hrs (i).

7.2 Experimento 2

1. Entrenar a ratas en el laberinto en cruz y verificar sus curvas de extinción, además intentar correlacionar la actividad del estriado con el aprendizaje y la extinción en el laberinto en cruz mediante la técnica de c-Fos.

Grupos control. Decidimos realizar el entrenamiento de ratas intactas a las 13:00hrs y 01:00hrs al igual que los entrenamientos en el laberinto de Barnes. En este caso se realizó un índice de respuestas correctas (número de ensayos entre número de respuestas correctas). Como se mencionó en la sección de métodos, el entrenamiento consta de 5 sesiones de 10 ensayos cada una. El índice de respuestas correctas se obtiene por sesión. Al final de las 5 sesiones de entrenamiento se realizan 2 sesiones de extinción de 10 ensayos cada una. Para la representación y análisis de los datos las dos sesiones de extinción los datos, fueron divididos en 4 bloques de 5 ensayos cada una. La primera división incluye los 5 primeros ensayos (51-55 en todos los gráficos), la segunda los siguientes 5 ensayos (56-60 en todos los gráficos) y así sucesivamente.

El análisis estadístico (ANOVA de dos vías grupo X sesión) demuestra que existe una diferencia significativa entre sesiones. La sesión uno fue significativamente diferente a todas las demás sesiones ($p < 0.001$, en todos los casos). A partir de la sesión dos y hasta la 5 no hubo diferencias significativas entre ellas, indicando que se alcanzó una meseta en el aprendizaje.

La sesión uno de extinción fue significativamente diferente a todas las demás sesiones ($p < 0.001$ en todos los casos). Como se observa en la figura 7.9 la mayoría de los ensayos se contabilizaron como error (en este caso un error representa acudir al brazo donde en las sesiones anteriores se daba el reforzador). Sin embargo, en todas las sesiones restantes los grupos regresaron al mismo nivel que en las últimas tres sesiones de adquisición (no se observaron diferencias significativas). Esto es indicador de que una vez que el reforzador era cambiado de lugar, las ratas rápidamente extinguían la antigua ruta y aprendían la nueva. El análisis entre los grupos luz y oscuridad no arrojó ninguna diferencia significativa.

Debido a que en esta prueba no encontramos ningún indicador de modulación diurna en la ejecución, decidimos realizar los siguientes experimentos solamente en la fase de luz. Este hecho podría parecer contradictorio con los datos antes presentados sin embargo, esta tarea es diferente y como se observa en su curva de aprendizaje, es aparentemente más sencilla de aprender ya que los sujetos presentan niveles elevados de precisión en la ejecución desde la segunda sesión de entrenamiento.

En este mismo experimento realizamos una serie de ensayos inmunohistoquímicos para determinar la actividad del estriado dorsolateral y del hipocampo en las diferentes fases del entrenamiento y la extinción. La comparación del estriado demuestra que existen diferencias significativas entre el día-0 y el día-1 ($p = 0.028$) y la extinción ($p = 0.048$) (Figura 7.10 a).

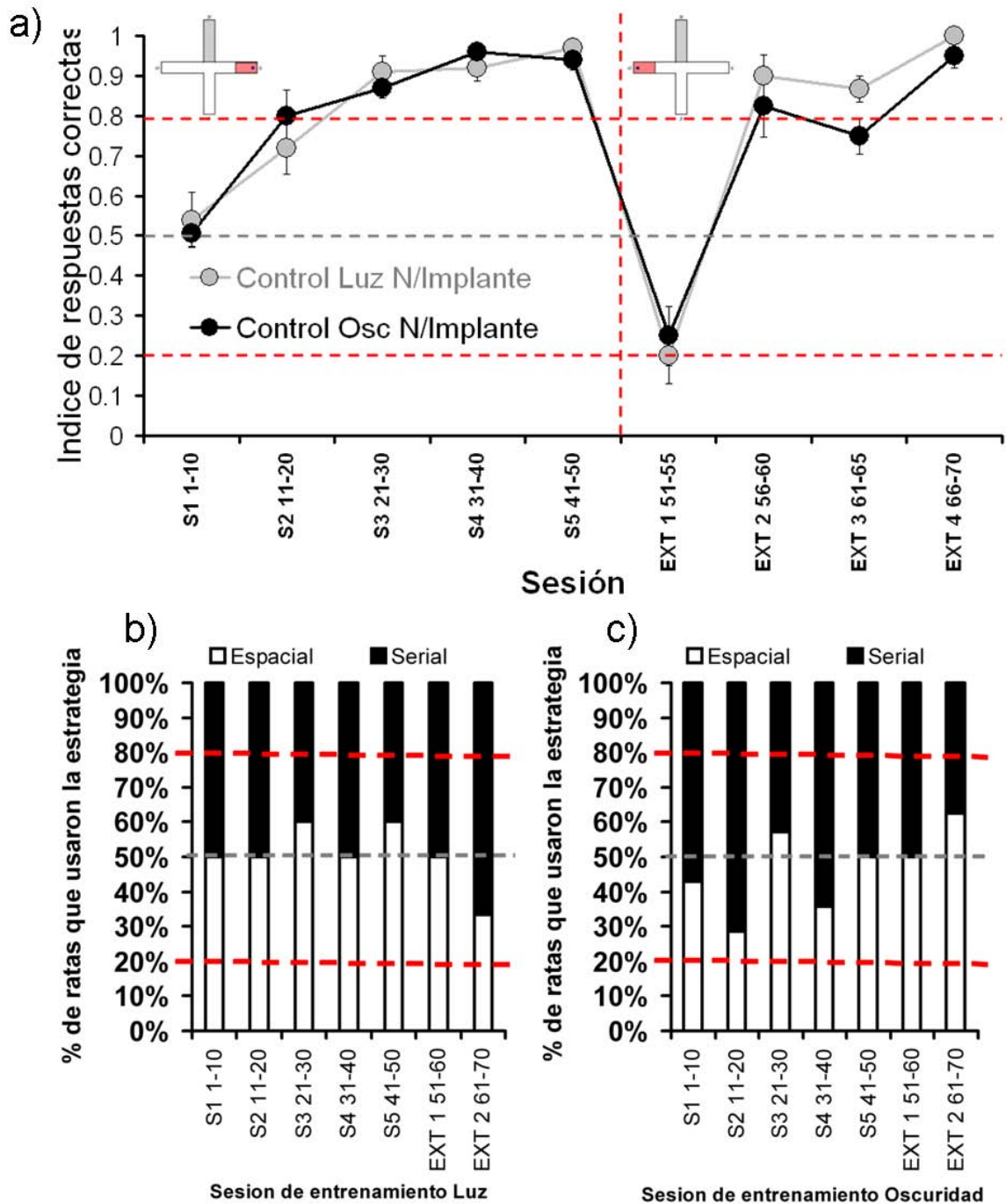


Figura 7.9 (a) Entrenamiento en el laberinto en T para los sujetos entrenados durante la fase de luz (**círculos grises**) y oscuridad (**círculos negros**) sin implantes. Las primeras 5 sesiones (**s1-s5**) corresponden al entrenamiento donde los sujetos recibían el reforzador en un brazo determinado como se observa en el laberinto inserto (reforzador en el brazo derecho marcado en rojo). Durante los ensayos de extinción (**EXT 1 - EXT 4**) los sujetos recibieron el reforzador en el brazo contrario al del entrenamiento (reforzador en el brazo izquierdo marcado en rojo). Estrategias para resolver el laberinto en T durante la fase de luz (**b**) y oscuridad (**c**)

Por su parte el hipocampo fue analizado de dos formas, en general (tomando en cuenta las tres subregiones juntas, CA1, CA3 y GD) y en particular (Tomando al CA3, CA1 y GD como regiones independientes). El análisis general muestra que el día-0 es significativamente diferente al día-1, día-5 y extinción. A su vez, el día-1 fue significativamente diferente al día-5 y la extinción, y finalmente el día-5 también fue significativamente diferente a la extinción ($p < 0.05$ en todos los casos) (Fig. 7.10 b). Individualmente, la región de CA1 mostró diferencias significativas entre el día-0 y el día-1, el día-5 y la extinción ($p < 0.001$ en todos los casos). Por su parte el día 1 se mostró significativamente diferente a la extinción ($p < 0.001$) (Fig. 7.10 e). La región de CA3 mostró diferencias significativas entre el día-0 y el día-5 y la extinción por su parte el día 1 se mostró significativamente diferente a la extinción ($p < 0.001$ en todos los casos) (Fig. 7.10 c). La región del GD no mostró diferencias significativas entre las diferentes fases del entrenamiento y la extinción (Fig. 7.10 d). La figura 7.11 muestra los cortes representativos para todas las regiones tomadas en cuenta para el análisis de c-Fos en las cuatro fases de experimentación.

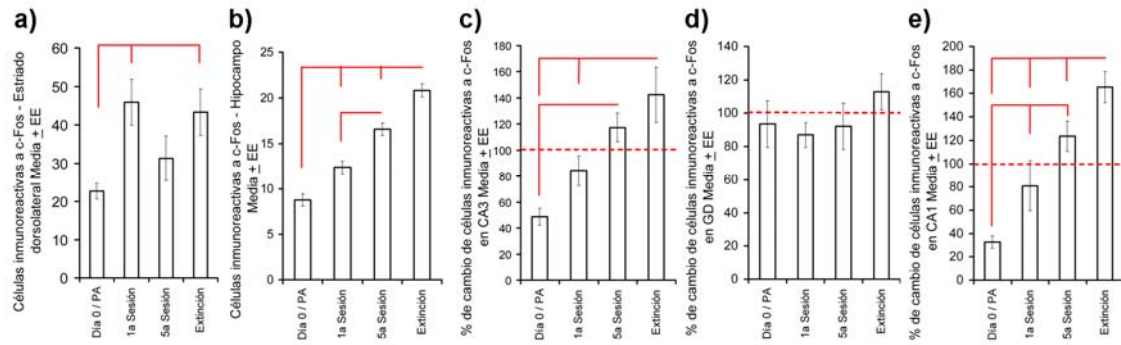


Figura 7.10 Representación grafica de la inmunoreactividad a c-Fos en el estriado dorsolateral (a), hipocampo general (b), CA3 (c), GD (d) y CA1 (e), en las diferentes fases del entrenamiento y la extinción para los sujetos control. Las diferencias significativas se presentan mediante líneas rojas entre las condiciones correspondientes. En c, d y e los resultados son expresados como porcentaje de cambio con respecto a al total de células inmunoreactivas a c-Fos en todas las condiciones experimentales para cada región, la línea punteada indica el 100%.

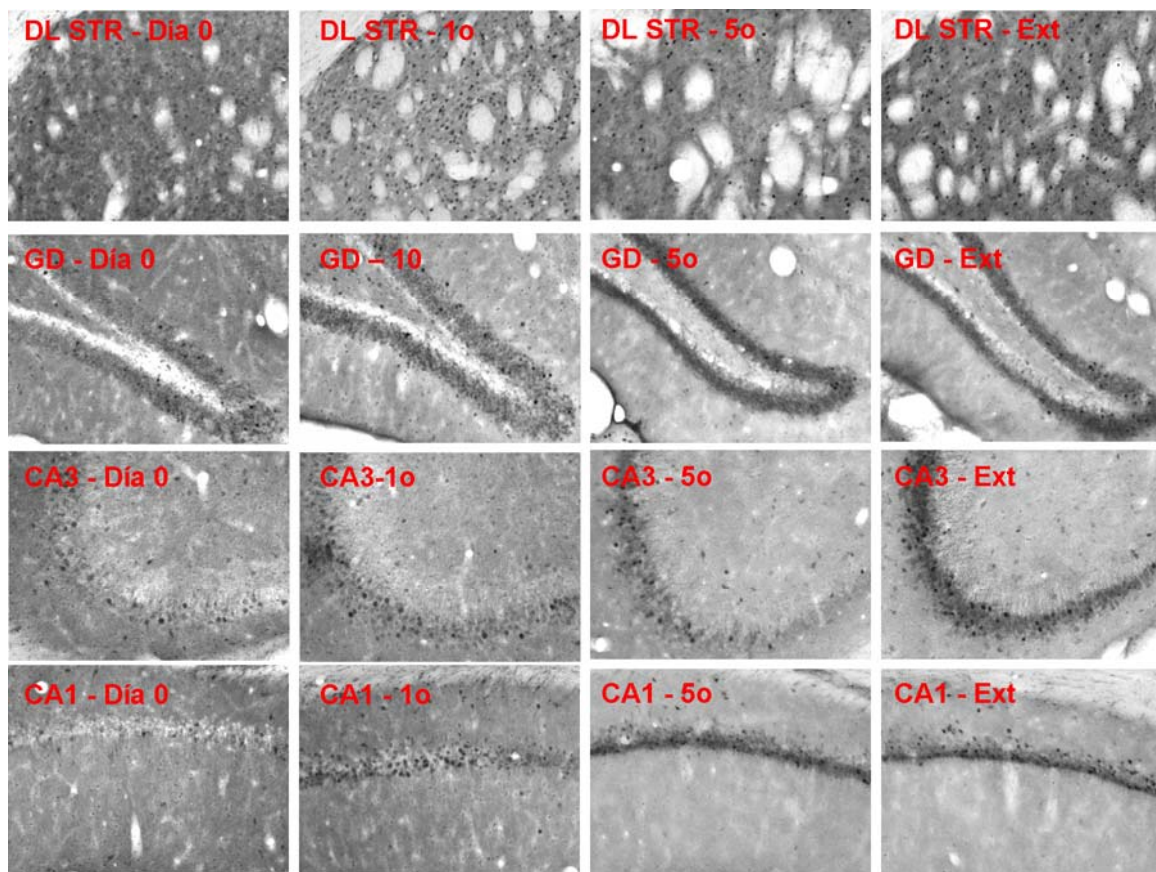


Figura 7.11 Cortes representativos de la inmunoreactividad a c-Fos en el estriado dorsolateral y las regiones del GD, CA3 y CA1 en el hipocampo de ratas en las diferentes fases del entrenamiento y la extinción, en cada corte se indica la condición correspondiente.

2. Administrar un antagonista del CB1 en el estriado dorsolateral durante la fase de extinción en el laberinto en cruz.

Realizamos una curva dosis respuesta para el AM251 y sus efectos en la extinción en el laberinto en T (AM251-0.4 μ g; AM251-1.6 μ g; AM251-3.2 μ g). Al comparar los resultados del entrenamiento (durante el entrenamiento ningún grupo fue administrado con ningún fármaco) mediante una ANOVA de dos vías (sesión x tratamiento) pudimos observar que todos los grupos presentaron las mismas características en la curva de aprendizaje (primeras 5 sesiones, no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos) (Fig. 7.12 a). Sin embargo, al observar la fase de extinción surgieron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control. En los primeros 5 ensayos de extinción, el grupo de AM251-3.2 μ g mostró ser significativamente diferente al control ($p=0.042$); mientras que los otros dos grupos no. En los segundos 5 ensayos, los tratamientos de AM251-3.2 μ g y AM251-1.6 μ g fueron significativamente diferentes al control ($p<0.001$) pero no así el de AM251-0.4 μ g. En el tercer bloque de extinción solamente el grupo AM251-3.2 μ g fue significativamente diferente al control ($p<0.001$). En el último bloque de extinción ningún tratamiento fue diferente al grupo control (Fig. 7.12 b). El grupo de AM251-3.2 μ g fue a su vez significativamente diferente al de AM251-0.4 μ g. en el primer ($p<0.001$) y el segundo ($p=0.02$) bloques de extinción. Estos datos muestran que la dosis más efectiva para bloquear la extinción fue la de AM251-3.2 μ g presentando efectos en 3 de los 4 bloques de extinción.

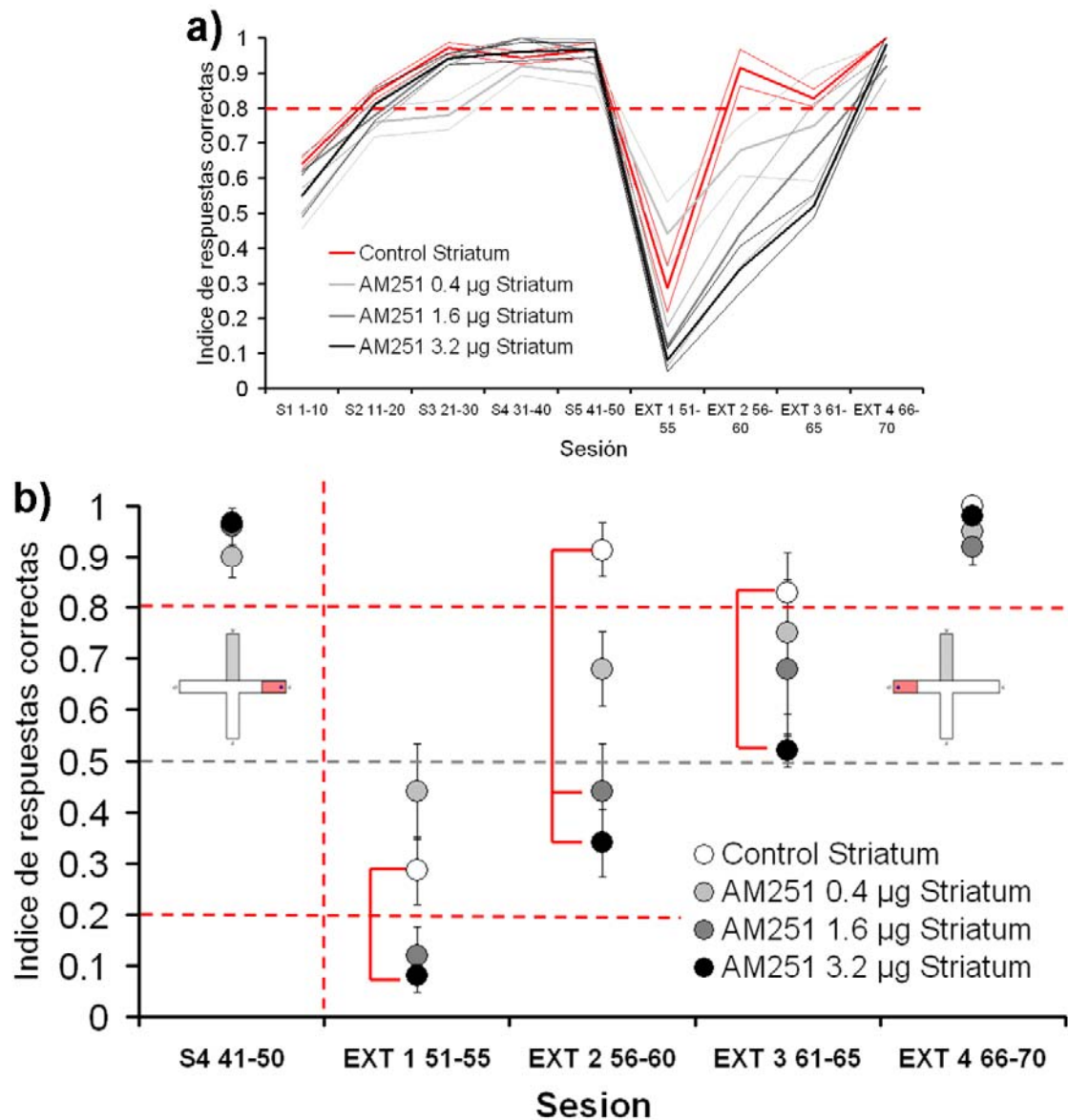


Figura 7.12 Curva dosis respuesta de AM251 en el laberinto en cruz. (a) Se muestran las curvas de aprendizaje para todos los grupos desde la sesión uno de entrenamiento hasta la última sesión de extinción. Obsérvese como la curva de adquisición no presenta diferencias significativas entre los diferentes grupos (s1 1-10 a s5 41-50), los datos se separan en la fase de adquisición cuando se administraron los diferentes tratamientos (EXT 1 a EXT 4). (b) Se muestra la última sesión de adquisición y las sesiones de extinción (datos después de la línea roja punteada horizontal). Las diferencias significativas se representan con las líneas rojas continuas entre los grupos correspondientes.

Los resultados del análisis inmunohistoquímico bajo la administración de la dosis más potente de AM251 (3.2 μg), revelan que esta produce un incremento significativo en la cantidad de células positivas a c-Fos en el estriado dorsolateral cuando se comparó con la extinción sin AM251 y el 5^o día de entrenamiento ($p < 0.001$ en ambos casos) (Fig. 7.13 a). Por su parte, la actividad en el hipocampo en general también se vio modificada, en este caso la administración de AM251 durante la extinción en el estriado indujo un decremento significativo en la actividad cuando se comparó contra la extinción sin AM251 ($p = 0.032$) (Fig. 7.13 b), este mismo efecto pudo observarse al observar la región de CA1 ($p = 0.004$) (Fig. 7.13 e). El GD y el CA3 no mostraron cambios significativos (Fig. 7.13 c y d).

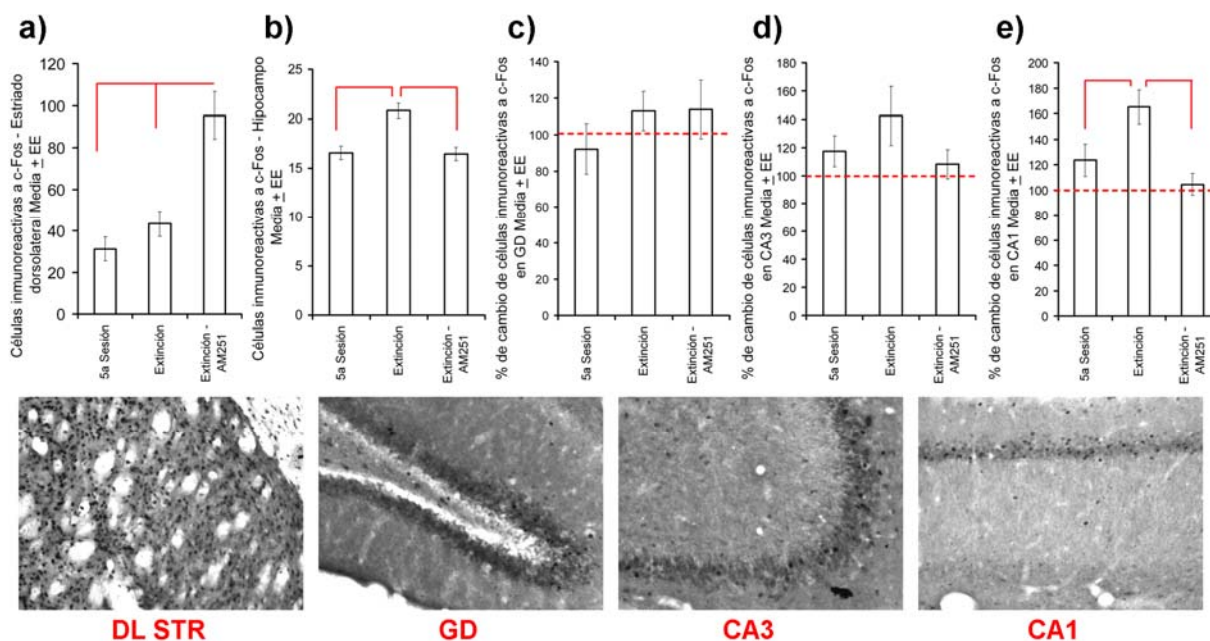


Figura 7.13 Representación grafica de la inmunoreactividad a c-Fos en el estriado dorsolateral (a), hipocampo general (b), CA3 (c), GD (d) y CA1 (e), durante la extinción con y sin AM251. Las diferencias significativas se presentan mediante líneas rojas entre las condiciones correspondientes. En c, d y e se presentan en igual que en la figura 7.10. Las micrografías en la parte inferior son cortes representativos de las diferentes regiones analizadas durante la extinción con AM251. Las micrografías para la extinción sin AM251 y 5^a sesión de entrenamiento se presentan en la figura 7.11.

También se realizó un análisis de correlación entre el hipocampo en general, las diferentes regiones del hipocampo y el estriado dorsolateral. Este análisis se encuentra resumido en la figura 7.14. Vale la pena resaltar la correlación entre las regiones CA3 y CA1 del hipocampo en las diferentes fases del entrenamiento. En este caso puede observarse una correlación positiva y significativa en el día 1 de entrenamiento ($cc=0.878$; $p=0.0499$), esta correlación desaparece en la 5ª sesión de entrenamiento ($cc=0.385$; $p=0.523$) y es recuperada en la sesión de extinción ($cc=0.877$; $p=0.0479$). Cuando los sujetos son entrenados bajo AM251 en el estriado durante la extinción, esta correlación no es recuperada ($cc=0.556$; $p=0.330$).

Día 0 / PA				
	CA1	GD	CA3	Hipocampo
Estriado DL	0.655; P=0.230	0.878; P=0.0501	0.881; P=0.0486	0.755; P=0.140
CA1		0.900; P=0.0372	0.882; P=0.0477	0.968; P=0.0068
GD			0.961; P=0.0091	0.965; P=0.0076
CA3				0.955; P=0.0112
Día 1				
	CA1	GD	CA3	Hipocampo
Estriado DL	0.0461; P=0.941	-0.448; P=0.450	-0.124; P=0.843	0.200; P=0.747
CA1		0.626; P=0.259	0.878; P=0.0499	0.966; P=0.00740
GD			0.373; P=0.537	0.488; P=0.405
CA3				0.886; P=0.0457
Día 5				
	CA1	GD	CA3	Hipocampo
Estriado DL	0.727; P=0.164	-0.309; P=0.613	0.847; P=0.702	0.729; P=0.162
CA1		-0.695; P=0.192	0.385; P=0.523	0.282; P=0.646
GD			-0.0521; P=0.934	0.364; P=0.547
CA3				0.831; P=0.815
Extinción				
	CA1	GD	CA3	Hipocampo
Estriado DL	0.148; P=0.812	0.492; P=0.400	0.191; P=0.758	0.215; P=0.728
CA1		0.334; P=0.583	0.877; P=0.0479	0.984; P=0.0024
GD			-0.109; P=0.861	0.320; P=0.600
CA3				0.885; P=0.0463
Extinción -AM				
	CA1	GD	CA3	Hipocampo
Estriado DL	-0.102; P=0.870	0.048; P=0.938	0.139; P=0.823	0.0280; P=0.964
CA1		0.799; P=0.105	0.556; P=0.330	0.947; P=0.0144
GD			0.252; P=0.682	0.876; P=0.0512
CA3				0.656; P=0.229

Figura 7.14 Cuadro de correlaciones entre las diferentes regiones analizadas. Las correlaciones significativas se encuentran marcadas en color gris. Las correlaciones significativas entre CA1 y CA3 son resaladas en rojo.

3. Administrar un antagonista del CB1 en el Hipocampo durante la fase de extinción en el laberinto en cruz.

Nuestros resultados, al igual que los de la literatura previa, sugieren que el estriado es el lugar donde la información de procedimientos es almacenada y por lo tanto es el lugar donde la conducta puede ser extinguida. Nuestros resultados también nos indican que la activación del CB1 es necesaria para esta extinción. Si esto fuera cierto, podríamos suponer que la administración del mismo antagonista en otra estructura no afectaría la extinción. Por esta razón, decidimos realizar el mismo protocolo de entrenamiento y extinción, sustituyendo las administraciones de AM251 en el estriado por administraciones del mismo antagonista pero en el hipocampo. La dosis que utilizamos fue la de 3.2µg por ser la más efectiva para inhibir la extinción en el estriado. En la figura 7.15 se despliegan los datos de las administraciones intrahipocampales y se comparan con el grupo de las administraciones intraestriatales. Al igual que en los casos anteriores al analizar los datos de la adquisición intra-grupo, se observa una diferencia significativa entre los diferentes días de entrenamiento, mostrando una curva de aprendizaje. No hubo diferencias entre los grupos. Durante la fase de extinción surgieron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control. En los primeros 5 ensayos de extinción el grupo de AM251-3.2µg en el estriado mostró ser significativamente diferente al control ($p=0.042$) y al grupo AM251-3.2µg en el hipocampo ($p<0.001$), a su vez el grupo de AM251-3.2µg en el hipocampo mostró un índice de errores significativamente menor al grupo control ($p=0.014$). En el segundo y tercer bloque de ensayos el AM251-3.2µg en el hipocampo fue significativamente diferente al de administración de

AM251 en el estriado (segundo bloque $p < 0.001$, tercer bloque $p = 0.006$) pero no fue diferente al grupo control. En el último bloque de extinción no se presentaron diferencias significativas (Fig. 7.15 b).

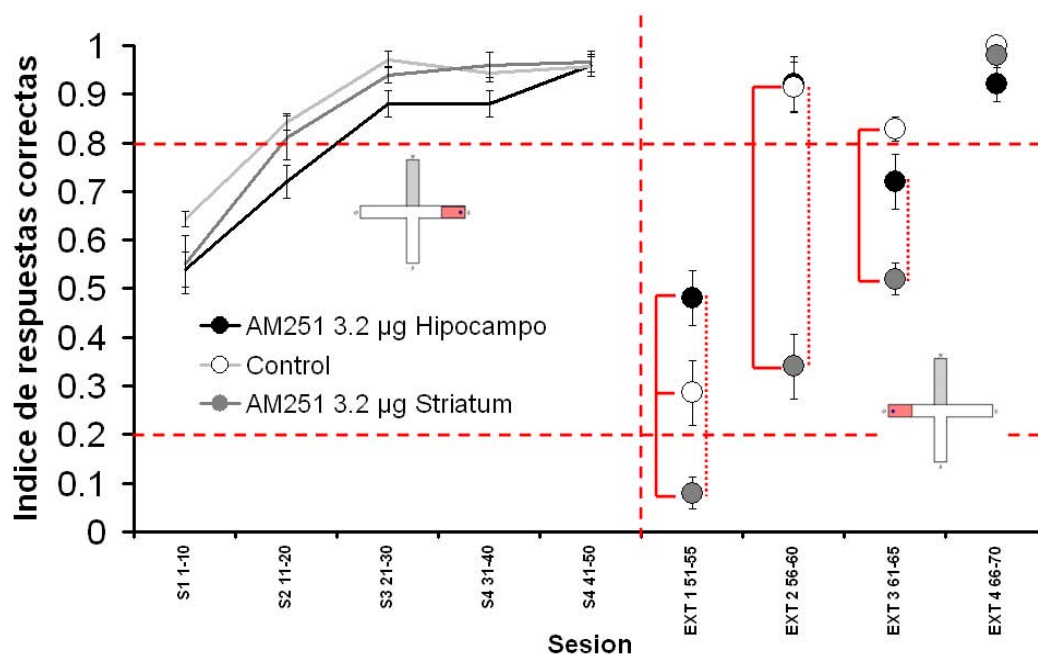


Figura 7.15 Administración de 3.2µg de AM251 en el hipocampo y el estriado en el laberinto en cruz. La parte izquierda del gráfico muestra las curvas de aprendizaje para los diferentes grupos hasta la quinta sesión de entrenamiento. Obsérvese como la curva de adquisición no presenta diferencias significativas entre los diferentes grupos (s1 1-10 a s5 41-50). La parte derecha después de la línea roja punteada vertical muestra las sesiones de extinción. Las diferencias significativas se representan con las líneas rojas continuas entre control y los experimentales, las líneas punteadas representan las diferencias significativas entre el grupo con administración hipocampal y estriatal de AM251.

En resumen, podríamos decir que la dosis más efectiva de AM251 para bloquear la extinción cuando se administra en el estriado no tiene efectos cuando se administra en el hipocampo y de hecho facilita la extinción. Los resultados muestran que la administración hipocampal de AM251 disminuye el índice de errores en el primer bloque de extinción y lo mantiene igual al control durante los siguientes bloques. Con esto podemos concluir que la extinción de la memoria de procedimiento está relacionada con la activación de sistema canabínico en el estriado.

8. Discusión

8.1 Experimento 1

- *Entrenar a ratas en dos puntos del ciclo luz-oscuridad (13:00 y 01:00) en el laberinto de Barnes para mostrar que existe una variación diurna en la expresión de estrategias.*

Como se había mostrado previamente, el entrenamiento en diferentes fases del ciclo produce la expresión de diferentes estrategias para resolver el laberinto de Barnes. Estos resultados se suman a las evidencias mencionadas en el apartado de variaciones diurnas, con la diferencia de que este paradigma nos permite evaluar la expresión de estrategias y por lo tanto la posible participación de diferentes estructuras como el hipocampo o el núcleo estriado sin afectar la capacidad general para resolver la tarea.

Como lo hemos mencionado, la estrategia espacial y serial son parte de un concepto que implica la participación del hipocampo y el estriado respectivamente. Al calificar un ensayo como espacial o serial estamos interpretando que una de estas estructuras tiene mayor relevancia en la solución de la tarea. Sin embargo, debido a que los criterios que utilizamos para clasificar una forma de escape como estrategia espacial o serial fueron establecidos arbitrariamente, no puede excluirse la posibilidad de que algunos datos que no cumplieron con estos criterios también formen parte del concepto espacial o serial. Por esta razón decidimos realizar el análisis de la distancia y la distribución de los errores.

La distancia nos indica que cuando los sujetos son entrenados durante la fase de luz, en la mayoría de los ensayos se dirigen en su primer movimiento a la zona espacial, mientras que los sujetos entrenados en la oscuridad no. Además de este indicador, tenemos la distribución de los errores, o el porcentaje de errores por ensayo que fueron cometidos dentro del área espacial. Este nos indica que durante la fase de luz los sujetos cometen la mayor cantidad de errores dentro de la zona espacial mientras que durante la fase de oscuridad este porcentaje disminuye importantemente. Tomando estos

dos parámetros juntos, podemos decir que durante la fase de luz los sujetos focalizan su exploración a la zona específica donde se encuentra el túnel de escape mientras que en la fase de oscuridad la exploración no está focalizada. Estas medidas son consistentes con los resultados obtenidos mediante la clasificación de estrategias, en donde se espera que para la estrategia espacial los sujetos se dirijan y exploren fundamentalmente en la zona espacial, mientras que en la estrategia serial no es requerida la exploración en un lugar específico.

- *Administrar ANA y un antagonista del CB1 (AM251) en el hipocampo y el estriado y valorar sus efectos en la ejecución en el laberinto de Barnes en ambas fases del ciclo luz-oscuridad.*

Lo primero que debe notarse es que ninguno de los tratamientos produjo un cambio significativo en el tiempo de ejecución en ninguna de las fases del ciclo. Esto se mantuvo para los sujetos entrenados bajo administraciones hipocampales o estriatales. Además todos los grupos mostraron el mismo patrón en su curva de aprendizaje con respecto al tiempo, es decir, en todos los grupos pudimos observar una disminución del tiempo para resolver la tarea conforme el entrenamiento avanzaba. Todos los grupos mostraron una estabilización de la curva en los últimos dos días de entrenamiento. Tomando estos datos juntos, podemos decir que ninguno de los tratamientos afectó significativamente la eficacia para resolver el laberinto.

Administración intrahipocampal de ANA. Las diferentes dosis de ANA administradas en el hipocampo sugieren que el hipocampo es responsable de la expresión de la estrategia espacial. Como puede observarse, por la disminución significativa de esta, así como la disminución en la exploración en la zona espacial y el aumento en la distancia evocada por las dosis más altas. Estos efectos fueron prevenidos mediante la administración combinada del antagonista AM251. Esto confirma que los efectos de ANA son mediados por el CB1.

Es muy importante notar que la administración de ANA en el hipocampo solo tuvo efectos cuando se realizó en la fase de luz, es decir, durante la fase de oscuridad ninguna de las tres dosis administradas produjo efectos sobre la conducta. Esto es consistente con la idea de que durante la fase de luz el hipocampo sería el responsable de facilitar la expresión de la estrategia espacial, mientras que durante la fase de oscuridad no, por lo tanto afectar farmacológicamente al hipocampo en la oscuridad no produciría ningún efecto puesto que naturalmente sería el estriado el responsable de la expresión de la estrategia serial.

Otro aspecto clave en este experimento fue la administración del antagonista AM251. En este caso, durante la fase de luz, no produjo efectos por sí mismo. Es decir, los sujetos expresaron normalmente una mayor cantidad de estrategia espacial. Durante la oscuridad sin embargo, los sujetos mostraron un incremento significativo en la estrategia espacial, así como una mayor exploración en la zona espacial. Todos estos parámetros sustentaron que el bloqueo del sistema canabinérgico en el hipocampo durante la fase de oscuridad facilitaría la estrategia espacial. Estos datos además sustentan la hipótesis de que el sistema canabinérgico está implicado en la expresión de las diferentes estrategias en el laberinto de Barnes.

Considerando el panorama completo podemos concluir que la facilitación del sistema canabinérgico en el hipocampo mediante la administración del agonista natural ANA produce una disminución en la estrategia espacial únicamente cuando esta administración ocurre en la fase de luz. Además, puede observarse que durante la fase de oscuridad, cuando naturalmente los sujetos no expresan la estrategia espacial, el bloqueo del sistema canabinérgico en el hipocampo resulta en la expresión de esta estrategia. Este hecho sugiere que el sistema canabinérgico está implicado en la expresión diferencial de la estrategia espacial mediante su activación en el hipocampo. En este sentido proponemos que durante la fase de luz, en el hipocampo el sistema canabinérgico estaría menos activo, produciendo un menor tono de inhibición y facilitando así la expresión de la estrategia espacial. Al contrario, durante la fase de oscuridad, el sistema canabinérgico estaría facilitado,

aumentado en consecuencia el nivel de inhibición y por lo tanto disminuyendo la probabilidad de la expresión de la estrategia espacial.

Administración intraestriatal de ANA. Como se ha descrito en la sección de resultados, ninguno de los tratamientos afectó significativamente las curvas de aprendizaje, y no pudieron observarse diferencias entre los grupos con respecto al tiempo de ejecución. Con respecto a la estrategia para resolver el laberinto, las diferentes dosis de ANA así como del AM251, administradas en el estriado, mostraron la misma tendencia: inefectivas durante la fase de luz y efectivas durante la fase de oscuridad. Brevemente, durante la fase de oscuridad todos los tratamientos, con excepción de ANA 0.5mg, disminuyeron significativamente la expresión de la estrategia serial, mientras que durante la luz no presentaron ningún efecto.

Dentro de este grupo de resultados nosotros consideramos dos eventos como relevantes. Primero, ninguno de los tratamientos tiene efectos durante la fase de luz. Dentro de la explicación a este fenómeno puede considerarse el hecho de que durante la fase de luz los sujetos expresan preferencialmente una estrategia espacial potencialmente modulada por el hipocampo. En tal caso, la intervención farmacológica en el estriado durante la fase de luz se vería enmascarada por la actividad del hipocampo. En contraparte, durante la fase de oscuridad, cuando los tratamientos en el hipocampo no tienen efecto, la modificación del sistema canabinérgico en el estriado resulta en la disminución de la estrategia modulada por este. En estas condiciones, este efecto no es enmascarado por el hipocampo puesto que la participación de este durante la fase de oscuridad sería menor como lo hemos propuesto anteriormente.

Otro efecto relevante durante la fase de oscuridad es que la administración del agonista así como la del antagonista, tuvieron los mismos efectos en la conducta. Lo primero que podría interpretarse es, que debido a que el antagonista falló en bloquear el efecto del agonista, entonces los efectos de ANA en el estriado no son mediados por el CB1. Esta interpretación puede ser rebatida por el hecho de que el antagonista por si mismo produce los mismos efectos, por lo que se hace necesaria una explicación que abarque ambos efectos. Como se puntualizó en la introducción, se ha demostrado que

la activación del CB1 en el estriado es indispensable para el establecimiento de LTD (Gerdeman y col, 2002; Ronesi y Lovinger, 2005). Si bien no es posible aun establecer el papel de la LTD en la solución del laberinto de Barnes, se ha sugerido que la LTD es necesaria para el correcto funcionamiento del estriado cuando éste se ha valorado en un modelo de Parkinson (Kreitzer y Malenka 2007). Este salto conceptual podría parecer un poco arriesgado, de no ser por que existen evidencias de pacientes parkinsonianos en los que el desempeño en tareas cognitivas relacionadas con el estriado esta deteriorado (Reber y Squire 1994; Knowlton y col, 1996; para revisión Pakard y Knowlton, 2002). Por esta razón sería esperado que al bloquear el CB1 en el estriado, la LTD en nuestras ratas estuviera disminuida y esto se viera reflejado en la incapacidad para desplegar la estrategia serial.

Esta explicación podría también aplicarse a los ensayos donde administramos la combinación del agonista y antagonista. Con respecto a la administración de ANA, las evidencias presentadas en el artículo de Kreitzer y Malenka (2007) muestran que la facilitación del sistema canabinérgico mediante un inhibidor de la degradación de ANA recupera hasta cierto punto la LTD y mejora algunos de los síntomas del parkinson. Esto sugeriría que la administración de ANA podría producir efectos similares, sin embargo nuestros datos no muestran este efecto. Una posible explicación a este fenómeno, es que como se ha reportado, los niveles mas elevados de ANA en el estriado dorsolateral se encuentran en el rango de 50 a 60 picomolar durante la fase de oscuridad y 5 a 10 picomolar en la fase de luz (Valenti y col, 2004). Nuestras administraciones fueron realizadas en el rango de los microgramos, concentraciones muy superiores a las fisiológicas. Como lo mencionamos en la introducción, una administración de agonistas canabinérgicos estaría afectando a las regiones presinápticas y postsinápticas donde se encuentre el CB1. Además de afectar tanto a células glutamatérgicas como GABAérgicas, dando como resultado una depresión generalizada de la excitabilidad del núcleo lo cual se acercaría al bloqueo temporal del estriado, dando como resultado la imposibilidad de la expresión de la estrategia serial como ya se ha demostrado ampliamente (Packard y col, 1989; McDonald y White 1993; Packard y Theather 1998; Jog y col, 1999). A pesar de que las dosis

empleadas en este estudio parecen no haber sido las adecuadas para producir la facilitación de la expresión de la estrategia serial. También podemos observar que la dosis mas baja de ANA no produjo efectos significativos, pero existe una ligera tendencia a disminuir la conducta aleatoria y aumentar la estrategia serial (Fig. 7.5). Quizás una dosis menor a esa podría revelar los efectos de facilitación.

Administración de ANA 2 horas después. Las administraciones en los experimentos anteriores fueron realizadas inmediatamente después de concluir el último ensayo de cada entrenamiento. Con este tipo de administraciones se busca afectar directamente los procesos implicados en la consolidación de la memoria (para revisión Lechner y col, 1999; McGaugh, 2000, véase capítulo 2) Los resultados obtenidos sugieren que la activación del sistema canabinérgico durante la fase de la consolidación de la memoria es suficiente para modificar la expresión de las estrategias. Sin embargo estos resultados no nos permiten asegurar que los efectos observados no se deben a un efecto sobre los mecanismos de evocación de la memoria o inclusive a mecanismos ajenos por completo a los procesos mnémicos. Esto es, es posible que nuestra manipulación farmacológica haya afectado por periodos largos de tiempo o inclusive permanentemente al hipocampo o al estriado. De tal manera que a pesar de administrar las drogas 24 horas previas a los ensayos de evocación esta pueda estar afectada. Este escenario parece poco probable debido a la rápida degradación de ANA (Di Marzo y col, 1994). Sin embargo, y para descartar cualquier otra posibilidad no contemplada, decidimos realizar el mismo protocolo de entrenamiento con la diferencia de que en este caso las drogas serian administradas dos horas después de concluido el último ensayo de cada sesión, tiempo suficiente para que los mecanismos de consolidación tuvieran lugar.

Como lo mostramos en la sección de resultados, la administración de ANA en el hipocampo durante la fase de luz y en el estriado durante la fase de oscuridad, dos horas después de terminada la sesión de entrenamiento, no tuvo consecuencias en ninguna de las variables observadas (Fig. 7.6). Este resultado de muestra que nuestra manipulación farmacológica es confiable y nos permite afirmar que el sistema canabinérgico participa en la expresión de

las estrategias mediante la modulación de la consolidación de la memoria en el hipocampo y el estriado y este efecto es dependiente de variaciones diurnas.

Nuestras manipulaciones solo nos permiten hacer interpretaciones acerca de la fase de consolidación de la memoria. Sin embargo, sería importante también delimitar la participación del sistema canabinérgico en el proceso de adquisición y evocación de la misma.

Otro aspecto que debe tomarse en cuenta en la interpretación general de los datos, es el hecho de que todos los experimentos, sin importar si fueron realizados en la fase de luz u oscuridad fueron conducidos bajo las mismas condiciones de iluminación. De esta manera, pudimos asegurar que las claves espaciales estuvieran disponibles en todos los grupos. En el caso de los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad, estos eran momentáneamente llevados a la cámara de registro (20 minutos como máximo), donde eran entrenados e inmediatamente después de concluir el registro eran regresados a su fase de oscuridad. El garantizar que todos los grupos tuvieron acceso a las claves espaciales nos indica que el cambio de estrategias observado en diferentes fases de el ciclo tiene que ver con un estado fisiológico diferencial mas que con la imposibilidad de orientarse espacialmente por falta de claves espaciales.

Para concluir con este apartado de conducta, sería útil hacer un resumen de los hallazgos hasta el momento, esto nos ayudara a ligar la discusión conductual con los resultados en biología molecular.

- En condiciones normales las ratas de la cepa Wistar expresan diferentes estrategias para resolver una tarea espacial en forma dependiente del ciclo luz-oscuridad, potencialmente el hipocampo y el estriado son los responsables de este fenómeno.
- El sistema canabinérgico participa en la modulación de la expresión de las estrategias; potencialmente inhibiendo la participación hipocampal durante la fase de oscuridad, dando como resultado la expresión de la estrategia serial.

- Los efectos mostrados hasta este punto se deben a la participación del sistema canabinérgico en la consolidación de las estrategias.
- El efecto diferencial de la administración de cannabinoides dependiente del ciclo luz oscuridad, sugieren un diferente estado del sistema canabinérgico en el hipocampo y el estriado, el cual es dependiente de la fase del ciclo.

Con estas conclusiones ahora revisaremos lo ocurrido en los experimentos en donde se cuantificó la cantidad de CB1 en el hipocampo y el estriado.

- *Realizar la cuantificación de proteínas y ARNm en el hipocampo y el núcleo estriado durante el ciclo luz-oscuridad.*

Como se mencionó en la introducción, existe evidencia de que el sistema canabinérgico varía su expresión a lo largo del ciclo luz oscuridad. Además los datos conductuales y farmacológicos aquí presentados apoyan esta idea. En este apartado se discuten los resultados que muestran que la expresión del CB1, medido con tres diferentes técnicas, varía su expresión a lo largo del ciclo luz-oscuridad en el hipocampo, mientras que en el estriado se mantiene estable. Esto apoya la idea de que el sistema canabinérgico, modula la conducta en forma dependiente del ciclo luz-oscuridad.

Las mayores concentraciones del CB1 en el hipocampo se presentaron durante la fase de luz (medida por la técnica de western blot e inmunohistoquímica). Adicionalmente, gracias a la técnica de inmunohistoquímica puede observarse que las principales diferencias se encuentran en el giro dentado mientras que las regiones de CA1 y CA3 son más estables. Por otro lado el ARN mensajero para el CB1 también mostró una clara variación diurna en el hipocampo. Sin embargo, el pico de mayor

concentración se encuentra desfasado 16 horas con respecto al pico de expresión de la proteína.

Los altos niveles del CB1 durante la luz en el hipocampo sugieren que en este momento existe un mayor nivel de inhibición en esta estructura. Sin embargo, como lo hemos mencionado en la introducción, el CB1 en el hipocampo puede expresarse en las terminales glutamatérgicas o GABAérgicas. Lamentablemente mediante nuestras técnicas no es posible determinar si las variaciones que encontramos son dependientes de la proteína presente en las células GABAérgicas o glutamatérgicas. Esto sería relevante debido a que la modulación de la liberación de GABA o glutamato resultaría en consecuencias diferentes sobre la excitabilidad de la célula. Esto también se vería reflejado en la conducta del animal.

Por otro lado se ha demostrado que en el hipocampo se requiere de una mayor concentración de cannabinoides para modular la liberación de glutamato que de GABA (Hajos y Freund, 2002). Además se ha demostrado que las concentraciones de ANA en el hipocampo son mayores durante la fase de oscuridad (contrario al CB1) (Valenti y col, 2004; Murillo-Rodriguez y col, 2006).

Como puede observarse existen varios factores que interactúan en la dinámica de las variaciones diurnas del sistema canabinérgico, esto hace complicada la interpretación de los resultados. En el panorama general en el hipocampo, durante la fase de luz el CB1 se encuentra alto, la ANA baja y el 2AG alto, mientras que durante la fase de oscuridad el CB1 y el 2AG se encuentran bajos y la ANA se encuentra alta. Durante la luz, se observa también una mayor probabilidad de expresar la estrategia espacial, por lo tanto esta estaría relacionada con las mayores concentraciones del CB1 y del 2AG y las más bajas de ANA en el hipocampo. Como hemos observado en los trabajos electrofisiológicos citados en la introducción, en el cerebro de la rata, durante la fase de luz es más sencillo evocar plasticidad sináptica (Harris y Tayler 1983; Raghavan y col, 1999) esto sugiere que el nivel elevado de modulación canabinérgica en el hipocampo durante la fase de luz podría estar reflejando en la inhibición de la transmisión GABAérgica y por lo tanto facilitando mecanismos plásticos y la expresión de una estrategia relacionada

con el hipocampo. Estas especulaciones no son en absoluto concluyentes; sin embargo, sí abren la puerta a nuevos experimentos para dilucidar el papel del CB1 en las terminales Glutamatérgicas y GABAérgicas y su relación con la conducta así como con las variaciones diurnas en el hipocampo.

Por otro lado, los niveles del CB1 en el estriado permanecieron constantes durante todos los puntos del ciclo medidos mediante la técnica de western blot. Los niveles del mensajero también permanecieron constantes. Por su parte, el análisis mediante inmunohistoquímica, demuestra una mayor expresión del CB1 en el punto de las 13:00 durante la fase de luz. Es probable que esta discrepancia entre las técnicas se deba a la forma en que las muestras fueron colectadas. En el caso de la inmunohistoquímica, el análisis pudo realizarse específicamente en la región del estriado dorsolateral. Para el western blot y el RT/PCR se tomó una muestra del estriado que incluía al estriado dorsomedial y gran parte del globo pálido interno y externo que como se ha descrito en la introducción que también expresan altas concentraciones del CB1 (Glass y col, 1997; Tsuo y col, 1998). Este tipo de muestreo pudo haber enmascarado las diferencias por el ciclo.

Sin embargo, los datos de la inmunohistoquímica deben valorarse con cuidado, con respecto a los datos del western blot y RT/PCR, debido a que en este caso solo fueron muestreados dos puntos del ciclo. En el caso del hipocampo vienen a confirmar lo que claramente se había visto con las otras dos mediciones, pero en el estriado no.

El hecho de que en el estriado se hayan encontrado niveles relativamente estables del CB1, nos hace pensar que el sistema canabinérgico en el hipocampo es el responsable del cambio de estrategias. En este sentido, si el hipocampo estuviera activo daría lugar a la estrategia espacial. En el sentido opuesto, si este baja su actividad entonces la probabilidad de expresar estrategia espacial disminuiría dando lugar a la expresión de la estrategia serial. En este contexto, nosotros nos apegamos a la propuesta de otros que sugiere que la interacción entre el hipocampo y el estriado dorsolateral controlaran la expresión de estrategias (Packard y McGaugh, 1989; McDonald

y White 1993; para revisión White y McDonald 2002) y proponemos que esta interacción estaría modulada por el sistema canabinérgico.

Los resultados de los experimentos discutidos en este apartado se encuentran reportados en el artículo publicado en el 2007 en la revista *Psychopharmacology* (Rueda-Orozco y col, 2007; véase anexo 1)

8.2 Experimento 2

- *Entrenar a ratas en el laberinto en cruz y verificar sus curvas de extinción. Además, intentar correlacionar la actividad del estriado con el aprendizaje y la extinción en el laberinto en cruz, mediante la técnica de c-Fos.*

Los primeros resultados son los correspondientes a los grupos control, sin manipulaciones farmacológicas, durante la fase de luz y oscuridad. En este caso, no se observaron diferencias entre los grupos entrenados durante la fase de luz y oscuridad. Las curvas de aprendizaje y extinción de ambos grupos están prácticamente empalmadas y el análisis estadístico no reveló diferencias significativas. Este resultado es similar a los encontrados en las curvas de aprendizaje en el laberinto de Barnes donde no hubo diferencias entre los grupos con respecto a los tiempos de ejecución.

Con respecto a las estrategias, tampoco pudieron observarse diferencias significativas entre los ciclos (Fig. 7.9 b y c). Estos resultados, están claramente en contraposición a los resultados obtenidos en el laberinto de Barnes, en donde observamos una clara diferencia en las estrategias en forma dependiente del ciclo luz oscuridad. Esto podría explicarse por el tipo de tarea utilizada. En este caso la dificultad para realizar la tarea es mucho menor que en el laberinto de Barnes en donde se presentan 40 posibilidades; mientras que en este laberinto la rata solo tiene dos posibilidades de respuesta. Otra posibilidad que ha recurrido en otros experimentos, es que el nivel de motivación inducido por la privación de alimento es muy alto y esto puede

enmascarar los efectos del ciclo luz oscuridad (McDonald et al, 2002). Estos experimentos abren la posibilidad para explorar las condiciones específicas en las que el ciclo luz oscuridad afectaría los procesos de memoria, mas que demeritar la gran cantidad de trabajos en donde se muestra una clara influencia del ciclo sobre los procesos cognitivos (Folkard 1975; May y col, 2005; Antoniadis y col, 2000; Devan y col, 2001; Ralph y col, 2002; Chawdhury y Colwell 2002; Valentinuzzi y col, 2004; Cain et al, 2004, 2007; Rueda-Orozco et al, 2007).

Debido a que no encontramos diferencias entre la fase de luz y oscuridad, los subsiguientes experimentos en este laberinto se realizaron en la fase de luz.

La actividad de c-Fos relacionada con las distintas fases del entrenamiento sugiere que el estriado y el hipocampo aumentan su actividad al inicio del entrenamiento, cuando la tarea comienza a aprenderse. Para el 5º día de entrenamiento, el estriado disminuye su actividad a niveles no significativos comparados con el control de caja. En esta etapa del entrenamiento la actividad motora de la rata es alta y estereotipada. Esto sugiere que el incremento en la actividad en el primer día de entrenamiento, es resultado del aprendizaje de la tarea más que de la actividad motora. La actividad del estriado durante la fase de extinción vuelve a incrementarse a niveles significativos, sugiriendo que cuando las condiciones de reforzamiento cambian, el estriado aumenta su actividad en forma parecida a las condiciones del primer día de entrenamiento. En la primera sesión de entrenamiento y en la sesión de extinción, se comparte la característica de que los sujetos son expuestos a nuevas condiciones de reforzamiento. Esto podría estar codificado por un aumento en la actividad del estriado como lo sugieren nuestros datos. Estos resultados son consistentes con las observaciones de Colombo y col. (2003) en donde a pesar de utilizar otra metodología de muestreo, también demuestran que la actividad del estriado dorsolateral incrementa por efecto del aprendizaje. Por otro lado, McIntyre y col. (2003) demuestran un incremento gradual en la liberación de acetilcolina en el estriado dorsolateral conforme avanza el entrenamiento. Esto sugiere que existe una aumento de la actividad estriatal. Sin embargo, con nuestras técnicas inmunohistoquímicas no es

posible determinar el tipo de células que se activan. Un análisis histoquímico más preciso sería de utilidad para determinar si el aumento de actividad observado se debe a las células principales o interneuronas. Esto podría establecer diferencias más claras entre las distintas fases del entrenamiento y la extinción.

Con respecto a la actividad del hipocampo en general, pudimos observar un aumento significativo en cada una de las fases analizadas (Fig. 7.10 b). Esto es, la actividad se incrementó en la primera sesión con respecto al control de caja, la quinta sesión incrementó significativamente con respecto a la primera y finalmente la sesión de extinción incrementó significativamente con respecto a la quinta sesión. Este aumento en la actividad hipocámpal fue inesperado debido a que la literatura sugiere que la actividad hipocámpal desciende conforme el entrenamiento avanza. Sin embargo, las mediciones de la actividad hipocámpal fueron realizadas separando a los grupos en “place learners” y “response learners” (Colombo y col, 2003; Chang y Gold, 2003). Por su parte, McIntyre y col. (2003) demuestran que la actividad del hipocampo medida mediante la liberación de acetilcolina se mantiene constante durante todo el entrenamiento, lo que va más de acuerdo con nuestros datos. Otro indicador que sugiere que la actividad del hipocampo no disminuye, son las células de lugar. Se ha mostrado que la actividad de estas células se mantiene estable mientras las condiciones ambientales no cambien (Wills y col, 2005; Leutbeg y col, 2005) por lo que en nuestras condiciones podríamos esperar que las células de lugar estén activas durante todo el entrenamiento. Estos mismos trabajos y otros (Robbe et al, 2006; Montgomery y Buzsaki, 2007; para revisión Eichenbaum, 2000) muestran que la actividad hipocámpal es necesaria para el almacenamiento y la recuperación de tareas espaciales como la nuestra.

Cuando analizamos la actividad del hipocampo por regiones independientes pudimos observar la misma tendencia que para el hipocampo en general en la región de CA3 y CA1, mientras que el GD permaneció estable durante las distintas fases del entrenamiento y la extinción (Fig. 7.10 c, d y e). El análisis de correlación arrojó resultados interesantes. En este caso pudimos observar correlaciones positivas significativas entre las regiones de CA3 y CA1 durante el primer día de entrenamiento, esta correlación se perdió en el quinto

día de entrenamiento. Si tomamos en cuenta que la actividad de estas regiones es, a pesar de todo, mas alta en la 5ª sesión de entrenamiento, nuestros datos sugieren que para el inicio del entrenamiento, donde la información se empieza a consolidar, se requiere de la coordinación del CA3 y el CA1. Sin embargo, en la 5ª sesión donde la información esta bien consolidada esta coordinación no es requerida, a pesar de que la actividad sea alta. A nuestras limitaciones metodológicas (c-Fos es una técnica que **no** permite observar la actividad en tiempo real). Nuestros resultados son consistentes con otros donde se sugiere que la actividad coordinada de CA3 y CA1 son necesarias para la codificación de la información relacionada con el hipocampo (Dragoi y Buzsaki, 2006; Montgomery y Buzsaki, 2007). La importancia de esta correlación es fortalecida por los datos de la sesión de extinción en donde la significancia en la correlación entre CA3 y CA1 es recuperada. Como lo habíamos mencionado, en esta fase experimental, las condiciones de reforzamiento son nuevas, parecidas a la fase inicial, lo que sugiere que la coordinación hipocampal es necesaria para la codificación de las nuevas condiciones.

Una vez delimitada la conducta y la expresión de c-FOS en condiciones normales, entonces realizamos las administraciones de AM251 en el estriado. Los resultados son muy claros al respecto, el bloqueo del CB1 en el estriado dorsolateral retrasa la extinción en una forma dosis dependiente. Los resultados de la cuantificación de c-Fos también son consistentes. Durante la fase de extinción, el AM251 administrado en el estriado dorsolateral incrementó significativamente la expresión de la proteína, indicando un incremento en la actividad estriatal. Es muy probable que este incremento se deba a la sobre-actividad de las proyecciones que provienen de la corteza cerebral (glutamatérgicas) que como se ha mostrado en la introducción (capítulo 3) están moduladas por la actividad del sistema canabinérgico, que en este experimento se encuentra bloqueado por medio del antagonista al CB1. El hipocampo por su parte muestra un decremento en la actividad cuando se le compara con los sujetos sin tratamiento farmacológico. También puede observarse que la correlación entre CA3 y CA1 se pierde. En este caso es difícil delimitar si el decremento en la actividad hipocampal es debido a la influencia que directamente podría tener el estriado sobre el hipocampo o a un

efecto compensador oir la mala ejecución inducida por la administración del antagonista en el estriado. En cualquiera de los dos escenarios, la actividad del hipocampo es disminuida como resultado de la manipulación del sistema canabinérgico en el estriado, sugiriendo que el hipocampo no puede codificar las nuevas condiciones de reforzamiento dando lugar a errores constantes en la ejecución.

Como lo mostramos en la introducción, el CB1 en el estriado se encuentra principalmente expresado en las terminales glutamatérgicas que provienen de la corteza cerebral (Kofalvi et al, 2005) En este contexto, es muy probable que nuestra administración este impidiendo la modulación de la liberación de glutamato desde la corteza. Esto ha sido ampliamente reportado y el resultado de este bloqueo es una imposibilidad para inducir la LTD (Gerdeman y col, 2002; Robbe y col, 2002; Kreitzer y Malenka, 2007, para revisión Lovinger y col, 2003). Es por lo tanto muy probable que nuestras administraciones estén impidiendo el establecimiento de la LTD. La ausencia de este mecanismo plástico estaría reflejándose en la incapacidad para detener la expresión de una respuesta que ya no es más favorable. Para poder asegurar esto, sería necesario demostrar que en nuestras ratas la administración de AM251 impide el establecimiento de LTD in vivo, ya que los experimentos realizados hasta el momento han comprobado esta idea pero únicamente in vitro.

También logramos demostrar la necesidad de que para esta tarea en específico el bloqueo del CB1 sea específicamente en el estriado, ya que las administraciones en el hipocampo no tuvieron el efecto de bloquear la extinción y al contrario la facilitaron. Se ha mostrado que la administración de antagonistas al CB1 pueden facilitar la consolidación de la memoria en tareas relacionadas con el hipocampo (Lichtman, 2000; Takahashi et al, 2005; Varvel et al, 2005) y en nuestros propios datos en el laberinto de Barnes puede observarse una facilitación de la estrategia espacial cuando el AM251 se administra directamente al hipocampo (Rueda-Orozco et al, 2007). Por lo tanto, el bloqueo del CB1 en el hipocampo en esta tarea facilitaría la utilización del hipocampo para resolver la tarea. Esto en combinación con el hecho de que el estriado estaría expresando LTD normalmente resultaría en la facilitación de la extinción.

Esta línea de pensamiento es consistente con los experimentos clásicos de disociación de sistemas de memoria, en donde se habla de una participación diferencial del hipocampo y el estriado en la solución de esta tarea (Packard et al, 1998). Así, el hipocampo estaría participando al inicio del entrenamiento y al final, y cuando la tarea se haya convertido en un procedimiento, el estriado sería el responsable de conducir la conducta. Por lo tanto, es probable que durante la extinción, el hipocampo deba volver a activarse y el estriado deba disminuir su actividad para codificar las nuevas condiciones experimentales. El sistema canabinérgico sería el responsable de la inactivación del estriado mediante el mecanismo de LTD, y esto daría lugar a que el hipocampo pudiera retomar la tarea. La necesidad del sistema canabinérgico en la extinción de la memoria ha sido bien comprobada en la amígdala en relación con recuerdos aversivos (Marcicano y col, 2002). También se ha mostrado que para la extinción en tareas espaciales la actividad del CB1 es necesaria (Varvel y col, 2005; Pamplona y col, 2006; Varvel y col, 2007; Niyuhire y col, 2007). Sin embargo, nuestros resultados son la primera evidencia de la necesidad de la activación del CB1 en el estriado dorsolateral en relación con una tarea específica. De esta forma también sería de esperarse que la activación del CB1 en el estriado mediante agonistas naturales o sintéticos facilitaría la extinción de la tarea.

Estos resultados podrían tener aplicación clínica, debido a que se ha demostrado que el circuito cortico-estriatal está altamente implicado en padecimientos psiquiátricos como el trastorno obsesivo compulsivo (TOC; para revisión Tekin y Cummings, 2002; Friedlander y Desrocher, 2006). En el TOC los sujetos muestran impulsos recurrentes, persistentes e irracionales así como actos y pensamientos obsesivos (DSM-IV). Se ha propuesto que los pacientes pueden mostrar una incapacidad para extinguir ciertos pensamientos y acciones con el resultado de la perseverancia de una acción o un pensamiento específico que no son necesarios, e inclusive indeseables, como en el caso de nuestras ratas perseverando en el antiguo lugar reforzado y mostrando por lo tanto un pobre desempeño para la nueva locación del reforzador.

Los resultados de los experimentos discutidos en este apartado se encuentran reportados en el artículo Rueda-Orozco y col, 2008; véase anexo 2.

8.3 Conclusiones Generales

En conclusión, nosotros proponemos que:

- El sistema canabinérgico esta implicado en la expresión de las estrategias en el laberinto de Barnes en forma dependiente del ciclo luz oscuridad.
- El hipocampo, que es el responsable de la estrategia espacial, es susceptible a la modulación diferencial dependiente del ciclo luz-oscuridad por parte del sistema canabinérgico.
- La modulación diferencial del sistema canabinérgico y su efecto sobre la conducta es dependiente de diferentes niveles del sistema canabinérgico (receptor y ligandos) a lo largo del ciclo luz-oscuridad.

También proponemos que:

- El sistema canabinérgico esta implicado en la extinción de memorias de procedimiento mediante su participación en el estriado dorsolateral. Esto podría tener implicaciones terapéuticas en padecimientos psiquiátricos relacionados con los núcleos de la base como la enfermedad de Parkinson o el trastorno obsesivo compulsivo.

9. Referencias

1. Achoff J (1981) Free running and entrained circadian rhythms. In: Aschoff J (eds) Handbook of behavioral neurobiology, vol. 4: biological rhythms. Plenum press, New York, pp 81-93
2. Acquas E, Pisanu A, Marrocu P, Di Chiara G (2000) Cannabinoid CB1 receptor agonist increase rat cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 401: 179-185.
3. Adams S, Raymond P, Kesner RP, Ragozzino ME (2001) Role of the medial and lateral caudate-putamen in mediating an auditory conditional response association. *Neurobiology of Learning and Memory*, 76: 106-116.
4. Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience*, 12: 366-375.
5. Alger BE (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68:247-286
6. Alger BE (2004) Endocannabinoids: Getting the message across. *Proc Natl Acad Sci* 101:8512-8513
7. Amaral DG, Kurz J (1985) The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat. 16: 33-39.
8. Ameri A (1999) The effect of cannabinoids on the brain. *Progress Neurobiol* 58:315-348
9. Ameri A, Wilhelm A, Simmet T (1999) Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *J Pharm* 126:1831-1839
10. Antoniadis EA, Ko CH, Ralph MR, McDonald RJ (2000) Circadian rhythms, aging and memory. *Behavioral Brain Research*, 114: 221-233.
11. Axelrod J, Felder C (1998) Cannabinoid receptors and their endogenous agonist, anandamide. *Neurochemical Research*, 5: 575-581.
12. Baddeley A (1998). *Memoria Humana: Teoria y Practica*. España: McGraw Hill.
13. Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: A neurobiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:74-104
14. Barnes CA, McNaughton BL, Goddard GV, Douglas RM, Adamec R (1977) Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system. *Science*, 197: 91-92.
15. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lyn SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277: 1094-1097.
16. Bidaut-Russell M, Devane WA, Howlett AC (1990) Cannabinoids receptor and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J Neurochem*, 55: 21-26.
17. Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V (2005) The endocannabinoid signaling system: Biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81:224-238
18. Bisogno T, Melck D, Bobrov MY, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabinomimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*, 351: 817-824.
19. Bliss TVP, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232: 331-356.

20. Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD (2000) Synaptic organization of the basal J Anat, 196: 527-542.
21. Bunsey M, Eichenbaum H (1996) Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature*, 379: 255-257.
22. Burwell RD, Witter MP, Amaral DG (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: A review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from monkey brain. *Hippocampus*, 5: 390-408.
23. Buszaki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33: 325-340.
24. Buzsaki G (2006) *The rhythms of the brain*. Oxford University Press, New York.
25. Cadas H, Gailllet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D (1996) Ciosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*, 16: 3934-3942.
26. Cain SW, Ko CH, Chamlers JF, Ralph MR (2004) Time of day modulation of conditioned place preference in rats depends on the strain of rat used. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81: 217-220.
27. Cain SW, McDonald RJ, Ralph MR (2007) Time stamp in conditioned place avoidance can be set to different circadian phases. *Neurobiology of Learning and Memory*, en prensa.
28. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, DiFilippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in neuroscience*, 30: 211-219.
29. Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992) Long-Term Potentiation in the striatum is unmasked by removing the voltage-dependent magnesium block of NMDA receptor channels. *Eur J Neurosci*, 4: 929-935
30. Campbell KA, Foster TC, Hampson RE, Deadwyler SA (1983) Δ 9-tetrahydrocannabinol differentially affects sensory evoked potentials in the rat dentate gyrus. *Journal of Experimental Therapeutics*, 239: 936-940.
31. Carlson G, Wang Y, Alger BE (2002) Endocannabinoids facilitates the induction of LTP in the hippocampus. *Nature*, 5: 723-724.
32. Cauler LJ, Boulos Z, Goddard GV (1985) Circadian rhythms in hippocampal responsiveness to perforant path stimulation and their relation to behavioral state. *Brain Research*, 1985: 117-130.
33. Chang Q, Gold PE (2003) Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J Neurosci*, 23: 3001-3005.
34. Charpier S, Deniau JM (1997) In vivo activity-dependent plasticity at corticostriatal connections: evidence for physiological long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 7036-7040.
35. Chaudhury D, Colwell CS (2002) Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res* 133: 95-108
36. Childers SR, Sexton T, Roy MB (1994) Effect of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochemical Pharmacology*, 47: 711-715.
37. Cobb S, Davies CH (2005) Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol*, 562.1: 81-88.
38. Colombo PJ, Brightwell JJ, Countryman RA (2003) Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J Neursoci*, 23: 3547-3554.
39. Comas M, Beersma DG, Spoelstra K, Daan S (2006) Phase and period responses of the circadian system in mice (*Mus musculus*) to light stimuli of different duration. *J Biol Rhythms* 21:362-372
40. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 9371-9376.

41. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384: 83-87.
42. Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signaling. *Life Sciences*, 78: 549-563.
43. Devan BD, Goad EH, Herbert LP, Antoniadis EA, Hong N, Ko CH, Leblanc L, Lebovic SS, Lo Q, Ralph MR, McDonald RJ (2001) Circadian phase-shifted rats show normal acquisition but impaired long-term retention of place information in the water maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 75: 51-62.
44. Devane DA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson A, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258: 1946-1949.
45. Devane WA, Axelrod J (1994) Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 6698-6701.
46. Di Chiara G, Morelli M, Consolo S (1994) Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends in Neuroscience*, 17: 228-233.
47. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372: 686-691.
48. Domenici MR, Azad SC, Marsicano G, Anja Shierloh, Wotjak CT, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Lutz B, Rammes G (2006) Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci*, 26: 5794-5799.
49. Dragoi G, Buzsaki G (2006) Temporal encoding of place sequences by hippocampal cell assemblies. *Neuron*, 50: 145-157.
50. Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci*, 89: 4363-4367.
51. Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty amide hydrolase and CB1 cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, 119: 481-496.
52. Egertova M, Elphick MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol* 422: 159-171
53. Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain.
54. Eichenbaum HE (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behavioral Brain Research*, 103: 123-133.
55. Eichenbaum HE (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Neuroscience Rev*, 1: 41-50.
56. Fernandez-Ruiz J, Jin Wang, Thomas GA, Mishkin M (2001) Visual habit formation in monkeys with neurotoxic lesions of the ventrocaudal neostriatum. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 4196-4201.
57. Folkard S (1975) Diurnal variation in logical reasoning. *Br J Psychol* 66:1-8
58. Folkard S (1979) Time of day and level of processing. *Mem Cognit* 7:272-274
59. Freiman I, Szabo B (2005) Cannabinoids depress excitatory neurotransmission between the subthalamic nucleus and the globus pallidus. *Neuroscience*, 133: 305-313.
60. Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470.

61. Friedlander L, Desrocher M (2006) Neuroimaging studies of obsessive-compulsive disorder in adults and children. *Clinical psychology Review*, 26:32-49.
62. Frotscher M, Leranth C (1985) Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 239: 237-246.
63. Fusco FR, Martorana A, Giampa C, De March Z, Farini D, D'Angelo V, Sancesario G, Bernardi G (2004) Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53:159-167
64. Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86: 1646-1647.
65. Gerdeman G, Lovinger DM (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*, 85: 468-471.
66. Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5: 446-451
67. Giuffrida A, Rodriguez de Fonseca F, Nava F, Loubet-Lescoulié P, Piomelli D (2000) Elevated circulating levels of anandamide after administration of the transport inhibitor, AM404. *European Journal of Neuroscience*, 408: 161-168.
68. Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG (2005) Anandamide transport: A critical review. *Life Sciences*, 77: 1584-1604.
69. Glass M, Dragunow M, Faull RLM (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77: 298-318.
70. Glass M, Felder C (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neuroscience*, 17: 5327-5333.
71. Gonzalez S, Scorticari C, Garcia-Arencibia M, de Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J (2006) Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Research*, 1073-1074: 209-219.
72. Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S (1998) Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Letters*, 422: 69-73.
73. Graybiel AM (1992) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neuroscience*, 13: 244-254.
74. Hampson RE, Deadwyler SA (1998) Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol Dis* 5: 474-482
75. Hampson RE, Deadwyler SA (1998) Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiology of Disease*, 5: 474-482.
76. Hampson RE, Deadwyler SA (2000) Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *J neurosci*, 20: 8932-8942.
77. Hansen HS, Lauritzen L, Strand AM, Moesgaard B, Frandsen A (1995) Glutamate stimulates the formation of N-acylphosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine in cortical neurons in culture. *Biochim Biophys Acta*, 1258: 303-308.
78. Hansen HS, Lauritzen L, Strand AM, Vinggaard AM, Frandsen A, Schousboe A. (1998) Characterization of glutamate-induced formation of N-acylphosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine in cultured neocortical neurons. *J Neurochem*, 69: 753-761.
79. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 98: 3662-3665.

80. Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM (2000) Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol* 392:147-156
81. Harris KM, Teyler TJ (1983) Age differences in a circadian influence on hippocampal LTP. *Brain Research*, 261: 69-73.
82. Harris KM, Teyler TJ (1983) Age differences in circadian influence on hippocampal LTP. *Brain Research*, 261: 69-73.
83. Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP (2006) Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem* 13:809-819
84. Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16: 710-715.
85. Hasselmo ME, McGaughy J (2004) High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Research*, 145: 207-31
86. Hebb D (1949) *The organization of behavior*. New York: Wiley.
87. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: A novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*, 38: 461-472.
88. Heyser CJ, Hampson RE, Deadwyler SA (1992) Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: alternations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264: 294-307.
89. Hilliard CJ, Edgemond WS, Jarrahian A, Campbell WB (1997) Accumulation of N-Arachidonyl ethanolamine (Anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochemistry*, 69: 631-638.
90. Hoffman AF, Lupica CR (2000) Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA_A synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 20:2470-2479
91. Hoffman AF, Riegel AC, Lupica CR (2003) Functional localization of cannabinoid receptors and endogenous cannabinoid production in distinct neuron population of the hippocampus. *European J Neurosci*, 18: 524-534.
92. Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. *Molecular pharmacology*, 26:532-538.
93. Howlett AC, Qualy JM, Khachartrian LL (1986) Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Molecular Pharmacology*, 29: 307-313.
94. Huang CC, Lo SW, Hsu KS (2001). Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol* 532:731-748
95. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, DePetrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Gepetti P, Walker JM, DiMarzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 99: 8400-8405.
96. Jay TM (2003) Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanism. *Progress in Neurobiology*, 69: 375-390
97. Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V, Graybiel AM (1999) Building neural representations of habits. *Science*, 286: 1745-1749.
98. Kandel E. (2000). *Principles of neural science USA*: McGraw Hill.
99. Kaneko S, Hikida T, Watanabe D, Ichinose H, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, Nakanishi S (2000) Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science*, 289: 633-637.
100. Katona I, Sperl agh B, Magloczky Z, Santha E, K ofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000). GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100:797-784

101. Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kofalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544-4558
102. Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006). Molecular composition of endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26: 5628-5637
103. Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci*, 26: 2991-3001.
104. Kemp N, Bashir ZI (2001) Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 65: 339-365.
105. Kimura M, Rajkowski J, Evarts E (1984) Tonicly discharging putamen neurons exhibit set-dependent responses. *Proc Natl Acad Sci*, 81: 4998-5001.
106. Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR (1996) A neostriatal habit learning system in humans. *Science*, 273: 1399-1402.
107. Kofalvi A, Rodriguez RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperlag B (2005). Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 16:2874-2884
108. Kreitzer AC, Malenka RC (2007) Dopamine modulation of state dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J Neurosci*, 25: 10537-10545.
109. Kreitzer AC, Malenka RC (2007) Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in parkinson's disease models. *Nature*, 445: 643-647.
110. Kujtan PW, Carlen PL, Kapur BM (1983) delta 9-Tetrahydrocannabinol and cannabidiol: dose-dependent effects on evoked potentials in the hippocampal slice. *Can J Physiol Pharmacol*, 61: 420-6.
111. Kulla A, Manahan-Vaughan D (2002) Modulation by serotonin 5-HT4 receptors of long-term potentiation and depotentiation in dentate gyrus of freely moving rats. *Cerebral Cortex*, 12: 150-162.
112. Kullman Dm, Asztely F, Walker MC (2000) The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol Life Sci*, 57: 1551-1561.
113. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
114. Lamprecht R, LeDoux J (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews*, 5: 45-54.
115. Lechner HA, Squire LR, Byrne JH (1999). 100 Years of consolidation – Remembering Muller and Pilzecker. *Learning and Memory*, 6:77-87.
116. Leranath C, Frotscher M (1987) Cholinergic innervation of hippocampal GSD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. *J Comp Neurol*, 261: 33-47.
117. Lerner RA, Siuzdak G, Prospero-Garcia O, Henriksen SJ, Boger DL, Cravatt BF (1994) Cerebrodiene: a brain lipid isolated from sleep deprived cats. *Proc Natl Acad Sci*, 91:9505-9508.
118. Leutbeg S, Leutbeg JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL, Moser MB (2005) Independent codes for spatial episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science*, 309: 619-623.
119. Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ (1995) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neuroscience*, 15: 4077-4092.

120. Li XG, Somogyi P, Tepper JM, Buzsaki G (1992) Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res*, 10: 519-525.
121. Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR (1995) Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 119: 282-90.
122. Lichtman AH, Martin BR (1996) Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology*, 126: 125-31.
123. Lichtman AH, Martin BR (1996). Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology* 126: 125-131
124. Lisman JE, Grace AA (2005) The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, 46: 703-713.
125. Lovinger DM, Tyler EC, Merritt A (1993) Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J Neurophysiology*, 5: 1937-1949.
126. Lowry OH, Roserough NJ, Farr L, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
127. Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature*, 266: 737-739
128. MacVicar BA, Tse FW (1989) Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 417: 197-212.
129. Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD an embarrassment of riches. *Neuron*, 44: 5-21.
130. Mallet PE, Beninger RJ (1998) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by Δ^9 -tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacology*, 140: 11-19.
131. Maren S, Quirk GJ (2004). Neuronal signaling of fear memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 844-52.
132. Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *European Journal of Neuroscience*, 11: 4213-4225.
133. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Gerhard R, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, 418: 530-534.
134. Martinez-Gonzalez D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal A, Henriksen SJ, Velazquez-Moctezuma J, Prospero-Garcia O (2004). Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neurosci Lett* 364:1-6
135. Martinez-Vargas M, Murillo-Rodriguez E, Gonzalez Rivera R, Landa A, Mendez-Diaz M, Prospero-Garcia O, Navarro L (2003). Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience* 117: 197-201
136. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346: 561-564.
137. Mátyás F, Yanovsky Y, Mackie K, Kelsch W, Misgeld U, Freund TF (2006) Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, 137: 337-361.
138. May CP, Hasher L, Foong N (2005). Implicit memory, age, and time of day: paradoxical priming effects. *Psychol Sci* 16: 96-100
139. McDonald RJ, White NM (1993) A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and the dorsal striatum. *Behav Neurosci*, 107: 3-22.

140. McDonald RJ, White NM (1994) Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol*, 61: 260-270.
141. McGaugh JL (2000). Memory – a century of consolidation. *Science*, 287: 248-251.
142. McGaugh JL, McIntyre CK, Power AE (2002) Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78: 539-552.
143. McIntyre CK, Marriott LK, Gold PE (2003) Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79: 177-183.
144. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50: 83-90.
145. Mishkin M (1982) A memory system in the monkey. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 298: 85-95.
146. Montgomery SM, Buzsaki G (2007) Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proc Natl Acad Sci*, 104: 14495-14500.
147. Morgan JI, Curran T (1989) Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trend in Neuroscience*, 12: 459-462.
148. Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus. *Neuron*, 9: 967-975.
149. Murillo-Rodriguez E, Desarnaud F, Prospero-Garcia O (2006). Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci* 79:30-37
150. Murillo-Rodriguez E, Giordano M, Cabeza R, Henriksen SJ, Mendez-Diaz M, Navarro L, Prospero-Garcia O (2001). Oleamide modulates memory in rats. *Neurosci Lett* 313:61-64
151. Murillo-Rodriguez E, Sanchez-Alavez M, Navarro L, Martinez-Gonzalez D, Drucker-Colin R, Prospero-Garcia O (1998). Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Research* 812:270-274
152. Nakamura EM, da Silva EA, Concilio GV, Wilkinson DA, Masur J (1991) Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. *Drug Alcohol Depend*, 28:167-75.
153. Narushima M, Uchigashima M, Hashimoto K, Watanabe M, Kano M (2006) Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *European Journal of Neuroscience*, 24: 2246-2252.
154. Nava F, Carta G, Battasi AM, Gessa GL (2000) D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *Br J Pharmacol*, 130: 1201-1210.
155. Nie J, Lewis DL (2001) The proximal and distal c-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate protein coupling. *Neuroscience*: 161-167.
156. Niyuhire F, Varvel SA, Thorpe AJ, Stokes RJ, Wiley JL, Lichtman AH (2007) The disruptive effects of the CB1 receptor antagonist rimonabant on extinction learning in mice are task specific. *Psychopharmacology*, 191: 223-231.
157. Nowicky AV, Teyler TJ (1987) The modulation of long-term potentiation by delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat hippocampus, in vitro. *Brain Research Bulletin*, 19: 663-672.

158. Ohashi S, Matsomoto M, Otani H, Mori K, Togashi H, Ueno K, Kaku A, Yoshioka M (2002) Changes in synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway induced by repeated treatments with fluvoxamine. *Brain Research*, 131-138.
159. Ohashi S, Matsumoto M, Togashi H, Ueno K, Yoshioka M (2003) The serotonergic modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway. *Neuroscience Letters*, 342: 179-182.
160. Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, 29: 729-738.
161. Okamoto, Morishita J, Tsuboi K, Tonais T, Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 279: 5298-5305.
162. Oliveira MGM, Bueno OFA, Pomarico AC, Gugliano EB (1997) strategies used by hippocampal- and caudate-putamen-lesioned rats in a learning task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68: 32-41.
163. Ong YW, Mackie K (1999) A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain. *Neuroscience* 92: 1177-1191.
164. Packard MG, Hirsh R, White NM (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J Neuroscience*, 9: 1465-1472.
165. Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci*, 25: 563-593.
166. Packard MG, Knowlton BJ (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563-593
167. Packard MG, McGaugh JL (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci* 106:439-446
168. Packard MG, McGaugh JL (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65-72
169. Packard MG, Teather LA (1998). Amygdala modulation of multiple memory systems: Hippocampus and Caudate-Putamen. *Neurobiol Learn Mem* 69:163-203
170. Pamplona FA, Prediger RDS, Pandolfo P, Takahashi RN (2006) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 188: 641-649.
171. Pamplona FA, Takahashi RN (2006) WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neuroscience Letters*, 397: 88-92.
172. Paré D (2003) Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Progress in Neurobiology*, 70: 409-420.
173. Paxinos G, Watson C (1986): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Inc.
174. Pettit DAD, Harrison HP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998). Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51: 391-402
175. Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Baker-Leese A, Felder CC (2002) *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301: 1020-1024.
176. Prado-Alcala RA, Grinberg ZJ, Arditti ZL, Garcia MM, Prieto HG, Brust-Carmona H. (1975) Learning deficits produced by chronic and reversible lesions of corpus striatum in rats. *Physiology and Behavior*, 15: 283-287.

177. Pruessner JC, LI LM, Serles W, Pruessner M, Collins DL, Kabani K, Lupien S, Evans AC (2000) Volumetry of hippocampus and amygdala with high-resolution MRI and three-dimensional analysis software: minimizing the discrepancies between laboratories. *Cerebral cortex*, 10: 433-442.
178. Raghavan AV, Horowitz JM, Fuller CA (1999) Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice. *Brain Research*, 833: 311-314.
179. Ralph MR, Ko CH, Antoniadis EA, Seco P, Irani F, Presta C, McDonald RJ (2002). The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behav Brain Res* 136:179-184
180. Reber PJ, Squire LR (1994) Parallel brain systems for learning with and without awareness. *Learning and Memory* 1: 217-229
181. Reding PJ, Dunnet SB, Robbins TW (1991) Dissociable roles of the ventral, medial and lateral striatum on the acquisition and performance of a complex visual stimulus-response habit. *Behavioural Brain Research*, 45, 147-161.
182. Revuelta AV, Moroni F, Cheney DL, Costa E (1978) Effect of cannabinoids on the turnover rate of acetylcholine in rat hippocampus, striatum and cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 304: 107-110
183. Robbe D, Alonso G, Chaumont S, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Role of P/Q-Ca²⁺ channels in metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent presynaptic long-term depression at nucleus accumbens synapses. *J Neurosci*, 22: 4346-4356.
184. Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ (2001) Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci*, 21: 109-116.
185. Robbe D, Bockaert J, Manzoni OJ, Metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent long-term depression in the nucleus accumbens is blocked in morphine withdraw mice. *European Journal of Neuroscience*, 16: 2231-2235.
186. Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 8384-8388.
187. Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G. (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci*, 9:1526-1533.
188. Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M (2005) The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and Alcoholism*, 40: 2-14.
189. Ronesi J, Lovinger DM (2005) Induction of striatal long-term synaptic depression by moderate frequency activation of cortical afferents in rat. *J Physiol*, 562.1: 245-256.
190. Ronesi J, Lovinger DM (2005) Induction of striatal long-term synaptic depression by moderate frequency activation of cortical afferents in rat. *J Physiol*, 562.1: 245-256.
191. Rueda-Orozco PE, Soria-Gomez E, Montes-Rodriguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospero-García O (2007) A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, Sep 6; [Epub ahead of print]
192. Sañudo-Peña MC, Tsou K, Walker JM (1999) Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life sciences*, 65: 703-713.
193. Scoville WB, Milner B (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20: 11-21.
194. Shen M, Pieser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996). Cannabinoid receptor agonist inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16:4322-4334
195. Shi LH, Luo F, Woodward DJ, Chang JY (2005) Dose and behavioral context dependent inhibition of movement and basal ganglia neural activity by Δ -9-

- tetrahydrocannabinol during spontaneous and treadmill locomotion tasks in rats. *Synapse*, 55: 1-16.
196. Soria-Gomez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, Cisneros M, Petrosino S, Navarro L, DiMarzo V, Propsero-Garcia O (2007). Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *Br J Pharmacol* (Epub ahead of print)
 197. Squire LR, Stark CEL, Clark RE (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*, 27: 279-306.
 198. Squire LR, Zola MS (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative systems. *Prco Natl Acad Sci*, 93: 13515-13522.
 199. Squire LR, Zola-Morgan S (1988) Memory: brain systems and behavior. *Trends in Neuroscience*, 11: 170-175.
 200. Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253: 1380-1386.
 201. Steward O, Scoville SA (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol*, 169: 347-370. s
 202. Sullivan JM (1999) Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 82: 1286-94.
 203. Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N (2004) Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J*, 380: 749-756.
 204. Szabo B, Dörner L, Pfreundtner C, Nörenberg W, Starke K (1998) Inhibition of gabaergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85:395-403
 205. Takahashi KA, Castillo PE (2006) The CB1 cannabinoid receptor mediates glutamatergic synaptic suppression in the hippocampus. *Neuroscience*, 139: 795-802.
 206. Takahashi RN, Pamplona FA, Soares-Fernandez M (2005) The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neuroscience Letters*, 380: 270-275.
 207. Tekin S, Cummings JL (2002) Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry an update. *J Psychosomatic Research*, 53: 647-654.
 208. Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity on neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology*, 14: 685-692.
 209. Terranova JP, Michaud JC, Le Fur G, Soubrié P (1995) Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WN55212-2: reversal by SR141716A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn-Schmiedeber's Arch Pharmacol*, 352: 576-579.
 210. Thompson RF (1986). The neurobiology of learning and memory. *Science*, 233: 941-947
 211. Thompson RF (2005). In search of memory trace. *Ann Rev Psychol*, 56: 1-23.
 212. Tolman EC (1948) Cognitive maps in rats and men. *Psychological Review*, 55(4): 189-208.
 213. Tolman EC, Ritchie BF, Kalish D (1946) Studies in spatial learning. II. Place learning versus response learning. *Journal of Experimental Psychology*, 36(3): 221-229.
 214. Tsou K, Mackie K, Sañudo-Peña C, Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing gabaergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, 93: 969-975.
 215. Tsuo K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1R receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411

216. Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG (2003) Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci*, 23: 9374-9384.
217. Valenti M, Vigano D, Cascio MG, Rubino T, Steardo L, Prolaro D, Di Marzo V (2004). Differential diurnal variations of AEA and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Molec Life Science* 61: 945-950
218. Valentinuzzi VS, Menna-Barreto L, Xavier GF (2004) Effect of circadian phase on performance of rats in the morris water maze task. *J Biological Rhythms*, 19: 312-324.
219. Vardaris RM, Weiz DJ, Teyler TJ (1977) Δ 9-tetrahydrocannabinol and the hippocampus: effects on CA1 field potentials in rats. *Brain Research Bulletin*, 2: 181-187.
220. Varvel SA, Cravatt BF, Engram AE, Lichtman AH (2006) Fatty acid amide hydrolase (-/-) mice exhibit an increased sensitivity to the disruptive effects of anandamide or oleamide in a working memory task. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 317: 251-257.
221. Varvel SA, Hamm RJ, Martin BR (2001). Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology* 157: 142-150
222. Varvel SA, Lichtman AH (2002) Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301: 915-924.
223. Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH (2007) Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology*, 32: 1032-1041.
224. Varvel, SA, Anum EA, Lichtman AH (2005) Disruption of CB1 receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology*, 179: 863-872.
225. Wade MR, Tzavara ET, Nomikos GG (2004) Cannabinoids reduce cAMP levels in the striatum of freely moving rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Research*, 1005: 117-123.
226. Wallmichrath I, Szabo B (2002) Cannabinoids inhibit striatonigral gabaergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience*, 113: 671-682.
227. Walsh JP (1993) Depression of excitatory synaptic input in rat striatal neurons. *Brain Research*, 608: 123-128.
228. Weisz DJ, Gunnel DL, Teyler TJ, Vardaris RM (1982) Changes in hippocampal CA1 population spikes following administration of delta-9-THC. *Brain Research Bulletin*, 8: 155-162.
229. White NM, McDonald RJ (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77:125-184
230. Wilkinson DM, Pontzer NJ (1987) The actions of THC on the intact hippocampus: a comparison of dentate and CA1 responses. *Brain Research Bulletin*, 19: 63-67.
231. Wills TJ, Lever C, Cacucci F, Burgess N, O'Keefe J (2005) Attractor dynamics in the hippocampal representation of the local environment. *Science*, 308: 873-876.
232. Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA (2001) Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, 31: 453-462.
233. Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588- 592
234. Witter MP (1989) Connectivity of the rat hippocampus. En *The hippocampus – New Vistas*. V Chan-Palay, Köhler C. edit. Alan R Liss Inc. New York.
235. Wyss M, van Groen T (1989) Development of the hippocampal formation. En *The hippocampus – New Vistas*. V Chan-Palay, Köhler C. edit. Alan R Liss Inc. New York.

236. Yanovski JA, Adler NT, Gallistel CR (1986). Does the perception of reward magnitude of self-administered electrical brain stimulation have a circadian rhythm? *Behav Neurosci* 100: 888-893
237. Yin HH, Davis MI, Ronesi JA, Lovinger DM (2006) the role of protein synthesis in striatal long-term depression. *J Neuroscience*, 26: 11811-11820.

10. Anexos

10.1 Anexo 1

El anexo 1 es el artículo que conjunta los principales resultados de mi proyecto de investigación, esto es, los datos del sistema canabinérgico y la solución diferencial en el laberinto de barnes de forma dependiente del ciclo luz-oscuridad. Fue aceptado en Julio del 2007 en la revista “Psychopharmacology”.

Referencia:

Rueda-Orozco PE, Soria-Gomez E, Montes-Rodriguez CJ, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospero-García O (2007) A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, Sep 6; [Epub ahead of print]

A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats

Pavel E. Rueda-Orozco · Edgar Soria-Gomez ·
Corinne J. Montes-Rodriguez ·
Marina Martínez-Vargas · Oscar Galicia ·
Luz Navarro · Oscar Prospero-García

Received: 7 November 2006 / Accepted: 26 July 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract

Rationale One of the adaptive abilities of the brain is the generation of a strategy to optimize acquisition of information, i.e., learning. In this study, we explored the role of environmental conditions (the light–dark cycle) and of the endocannabinoid anandamide in rats to select a strategy to solve the Barnes maze (BM).

Objectives To determine the effects of manipulating the cannabinergic system on a spatial task in relation to the light–dark cycle.

Materials and methods Rats received an intrahippocampal or intrastriatal administration of anandamide, AM251, or their combination at two different points of the light–dark cycle (1300 and 0100 hours), and their performance in the BM was evaluated. In addition, we determined the expression of the cannabinoid 1 receptor (CB1R) in the hippocampus and striatum throughout the light–dark cycle.

Results Results indicate that rats solved the BM by using a spatial strategy during the light phase and a procedural (serial) strategy during the dark phase of the cycle. CB1R expression varied in the hippocampus, being higher at 1300 hours and lower at 0100 hours, whereas its expression remained unchanged in the striatum.

Conclusions Changes in the brain, which include changes in the endocannabinoid system, prompt it to use different strategies (spatial and procedural, or others not evaluated in this study) to cope with the environmental demands. These cerebral changes are adaptive responses to the light–dark cycle.

Keywords Learning and memory · Anandamide · Cannabinoid receptor · Circadian rhythms · Hippocampus · Striatum

Introduction

The cannabinergic system has been implicated in many physiological processes, such as control of movement (Ameri 1999), food intake (Hao et al. 2000; Martinez-Gonzalez et al. 2004; Soria-Gomez et al. 2007), sexual behavior (Martinez-Gonzalez et al. 2004), sleep (Murillo-Rodriguez et al. 1998, 2001), learning and memory (Murillo-Rodriguez et al. 1998, 2001; Hampson and Deadwyler 1998). One of the reasons for this high variety of cannabinergic functions is the widespread cannabinoid 1 receptor (CB1R) expression in almost all the central nervous system (Tsuo et al. 1998; Pettit et al. 1998; Egertova and Elphik 2000). We reported that the CB1R (protein and mRNA) fluctuates in the pons of rats after the light–dark cycle, exhibiting the highest concentration during light (Martinez-Vargas et al. 2003). On the other hand, it has been shown that the amount of the endogenous cannabinoids, anandamide (ANA) and 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG), also fluctuates according to the light–dark cycle in the nucleus accumbens, the prefrontal cortex, the hippocampus, the hypothalamus, and the striatum of rats (Valenti et al. 2004; Murillo-Rodriguez et al. 2006). These variations in the amount of endocannabinoids and their receptors suggest

P. E. Rueda-Orozco · E. Soria-Gomez · C. J. Montes-Rodriguez ·
M. Martínez-Vargas · L. Navarro · O. Prospero-García (✉)
Grupo de Neurociencias, Depto. de Fisiología,
Fac. de Medicina, UNAM,
Apdo., Postal 70-250, Mexico, D.F. 04510, Mexico
e-mail: opg@servidor.unam.mx

O. Galicia
Grupo de Neurociencias, Depto de Psicología,
Universidad Iberoamericana,
Mexico, D.F. 01210, Mexico

that the level of modulation given by the cannabinergic system could vary according to the hour of the day. In this work, we focus on the potential modulation on memory systems (hippocampus and striatum).

During acquisition of information, individuals utilize different strategies that make this process much more efficient. We do not know how a specific strategy from a repertoire of strategies is chosen to contend with a specific problem. However, there is an extensive literature involving specific brain structures in the regulation of specific strategies. For example, a procedural strategy is regulated by the striatum, whereas a spatial strategy is regulated by the hippocampus (Packard and McGaugh 1992, 1996; White and McDonald 2002). If these structures are actually playing these roles, questions we may ask are, when does one structure govern the behavioral output and which are the mechanisms subserving the selection? To obtain some responses to this matter, we studied the effect of the light–dark cycle and the effect of endocannabinoids on the solution of the Barnes maze (BM), a task that can be solved by using different strategies (Harrison et al. 2006).

The rationale to study the dependence of the strategy selection on the light–dark cycle was based on the observation that mental efficiency changes along the day (from 0800 to 2300 hours) in humans (Folkard 1975, 1979; May et al. 2005). These changes have been attributed to changes in the strategy to acquire the information but not to changes in the capacity to process information (Folkard 1975, 1979; May et al. 2005). Another study shows that the recall of implicit and explicit information in humans depends on the time of the day tests are applied, suggesting different circadian fluctuations for explicit and implicit retrieval (May et al. 2005). Moreover, studies performed in animals have also supported that the solution of different memory tasks depends strongly on the light–dark cycle (Chaudhury and Colwell 2002; Ralph et al. 2002).

On the other hand, it has been shown that both Δ -9 tetrahydrocannabinol (THC) and ANA deteriorate memory consolidation in several behavioral paradigms (Lichtman and Martin 1996; Varvel et al. 2001; Murillo-Rodriguez et al. 1998, 2001). However, it has also been suggested that THC might induce a shift in the strategy to solve the task (Hampson and Deadwyler 1998), potentially depending on the availability of the receptor during the course of the day (Martinez-Vargas et al. 2003) or of the endogenous ligand (Valenti et al. 2004; Murillo-Rodriguez et al. 2006).

Based on these THC and ANA effects on memory, the diurnal variations of the CB1 expression, and the level of endocannabinoids and the diurnal variations of behavior, we hypothesize that the cannabinergic system modulates the performance on a memory task depending on the light–dark cycle. We decided to analyze whether ANA administered directly into the hippocampus or into the dorsolateral

striatum affects the performance of rats in the BM and that such an effect depends on the light–dark cycle. In addition, to further characterize the potential role of the endocannabinoid system in this process, we determined the diurnal variations in the expression of the CB1R in the striatum and hippocampus.

Materials and methods

Subjects

For all the experiments, Wistar albino male rats (weight, 250–300 g) were used. They were housed individually in a temperature-controlled environment with a 12-h light/dark cycle (lights on at 8:00 A.M.) and ad libitum access to food and water. Rats were housed individually 5 days before the surgery and throughout the entire experiment.

Drugs

Arachidonylethanolamide (ANA) and the CB1R antagonist AM251 were obtained from Sigma Aldrich and Cayman Chemical, respectively. The concentrations for intrahippocampal and intrastriatal administrations were 0.5 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ (ANA0.5 μg), 1 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ (ANA1 μg), and 2 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ (ANA2 μg) of ANA dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) in phosphate-buffered saline (PBS; 30%) and 1.6 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ of AM251 dissolved in DMSO in PBS (30%; equimolar concentration to the ANA1 μg concentration).

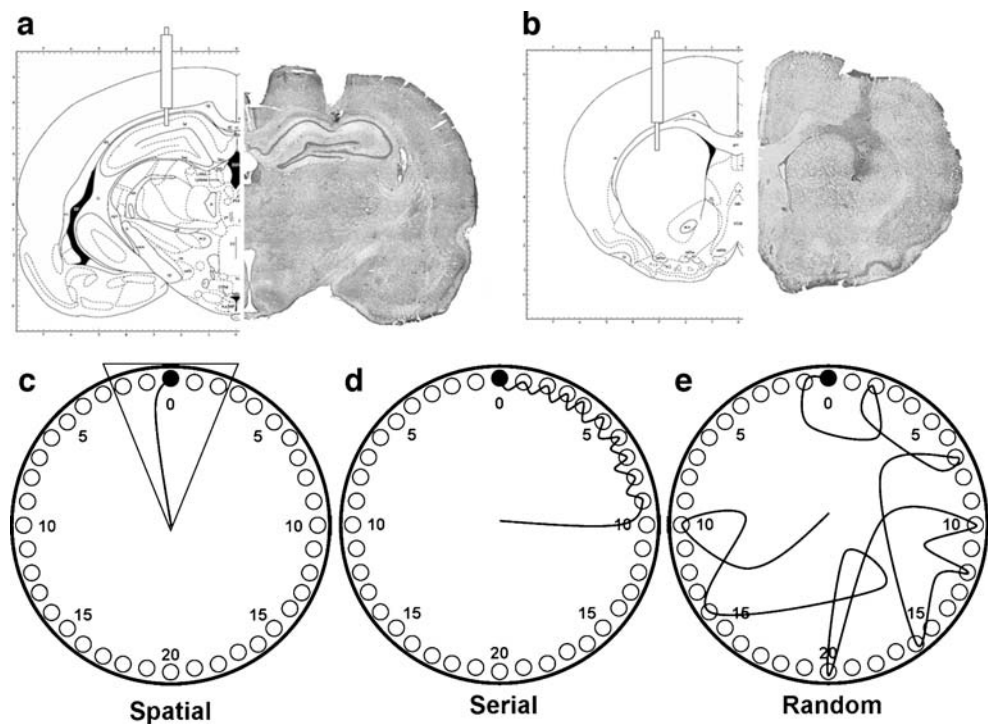
Surgery

Ten days before the behavioral training, rats were implanted bilaterally under anesthesia (cocktail: ketamine 66 mg/kg + xylazine 0.26 mg/kg + acepromazine 1.3 mg/kg) with guide cannulae (23 gauge) directed to either hippocampus ($P=4$, $L=2.5$, $V=2.2$; Fig. 1a) or either dorsolateral striatum ($a=0.2$, $L=3.0$, $V=3.0$; Fig. 1b). The injector protruded 1 mm from the tip of the guide cannula. Three supporting stainless steel screws were implanted into the skull. The brains were prepared for histological analysis with cresyl violet staining to verify the correct placement of the injector (Fig. 1a, b)

Barnes maze

This maze (Barnes 1979) consists of a 150-cm-diameter and 3.5-cm-thick circular wooden disk, elevated 90 cm above the floor. Forty holes, 7 cm in diameter, were equidistantly located around the perimeter and centered 5 cm from the edge. A black wooden escape tunnel (10 \times 10 \times 30 cm) was placed beneath one hole, selected randomly

Fig. 1 Schematic and photomicrographic representation of the injection sites in the hippocampus (a) and striatum (b). Strategies: representation of spatial (c), serial (d), and random behavior (e). For further description, refer to the text



for each rat, the position of the escape tunnel remained in the same spatial place for the entire training.

BM solution To solve this maze, rats are placed inside a cylindrical chamber located at the center of the maze. When they are set free from this chamber, rats start searching randomly for the escape tunnel. While the training progresses, rats switch from random searching to one of two strategies, spatial or serial.

Spatial strategy For a strategy to be considered spatial, rats had to comply with the following criteria: Rats had to go directly to the target zone (two holes on each side of the target hole, five holes total) and keep exploring there (Fig. 1c). If rats explored a hole outside this range, the strategy was not considered spatial. Neither the time nor the number of errors was taken into account to qualify a strategy as spatial.

Serial strategy For a strategy to be considered serial, rats had to comply with the following criteria: They had to explore holes in sequence (one after the previous adjacent) and following one direction. If these criteria were not reached, the strategy was not considered serial. Rats could start exploring at any hole, but if they searched the target zone, only there the strategy was considered spatial. Neither the time nor the number of errors was taken into account to qualify this strategy as serial (Fig. 1d). Any other way to approach the target hole was considered a *random behavior*

(Fig. 1e). We also quantified the total time of performance in the maze to reach the target hole. Each nontarget hole visited was considered an error, and the number of holes between the first hole explored and the target one was considered the “distance.” At the end, as a complementary measure of behavior, we plotted the percentage of errors made in the target zone.

Training

Animals were trained to solve the BM during one session on each of the five successive days at 1300 or 0100 hours. Each session consisted of four trials, for a total of 20 trials in 5 days. On the first trial, rats were placed into the escape tunnel for 1 min. At the end of this time, rats were placed at the center of the BM, inside the cylindrical chamber, and a white noise (90 dB) was delivered by a speaker located 1 m above the center of the maze, affixed to the room’s ceiling. Rats were left in this chamber for 10 s and then set free to explore the maze and find the escape tunnel. The trial ended when the rat entered the escape tunnel or once 4 min had elapsed. When the rat entered the escape tunnel, the white noise was turned off, and the rat was allowed to stay in the tunnel for 1 min. The escape tunnel was always located beneath a hole positioned in the same place with regard to the room. In this way, although we turned the BM around, for each rat in every single trial, the escape tunnel was always in the same place. The position of the escape tunnel was selected randomly for each rat at the beginning of the

training. Light (approximately 50 lx) was always on during the training session, regardless of the phase of the cycle. The training session lasted 20 min at the most.

Immediately after the end of the last trial of each day, rats were injected directly into the hippocampus or dorsolateral striatum with the corresponding treatment. ANA administration was performed at the end of each training session because endocannabinoids are involved in plastic processes, they might affect memory consolidation, and ANA is quickly inactivated by the cellular enzymes (for review, see Bisogno et al. 2005); in this way, we were able to avoid undesirable effects on locomotor activity and memory evocation on the next day. A videotape of each rat's performance was recorded for off-line analysis.

In the second experiment, two different groups of rats were trained in exactly the same way as previously described, except that, in this case, drug administration was conducted 2 h after the end instead of immediately after the training session. This noncontingent administration would allow us to determine whether the effects of the treatments were related to consolidation of memory or not.

Cannabinoid receptor determination

Western blotting

To assess the CB1R protein expression, tissue samples were collected at six different time points of the light–dark cycle (0900, 1300, 1700, 2100, 0100, and 0500 hours; $n=10$ rats per point). Samples were processed independently. Samples were homogenized in PBS with protease inhibitors and centrifuged at $600\times g$, 10 min, 4°C . The supernatant was centrifuged at $39,000\times g$, 15 min, 4°C . Twelve percent analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described elsewhere (Laemmli 1970). Briefly, resuspended precipitate of tissue homogenates (15 μg protein) was mixed 1:1 with sample Laemmli buffer and heated (95°C , 5 min) before loading on a 0.75-mm-thick gel. Samples were subjected to electrophoresis (150 V, 2 h), and gels were transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) at 100 V for 1 h at 4°C . The membrane was incubated with 3% PBS-Tween, 10% nonfat dry milk, and 2% normal goat serum for 30 min at room temperature (rt), followed by incubation with anti-CB1R (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) 1:1,600 overnight at 4°C . The blot was washed with PBS-Tween (three times, 5 min/each), then incubated 1 h at rt in a 1:2,000 dilution of goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate, and developed with diaminobenzidine (0.5 mg/ml in PBS plus 0.3 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 30% H_2O_2). Density of bands was analyzed using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

RNA extraction

To detect changes in CB1R mRNA expression, samples were collected at the same six time points of the Western blot assay ($n=5$ per point). Total RNA was extracted using the TRIzol method (Life Technologies, Rockville, MD, USA). In brief, 100 mg of tissue was homogenized in 1 ml of TRIzol; 200 μl of chloroform was added and mixed in a vortex. Two phases were obtained by centrifuging at $12,000\times g$ for 10 min. The aqueous phase was recovered, and 0.5 ml of isopropanol was added. Total RNA was obtained by centrifugation at $12,000\times g$ for 10 min. Its integrity was confirmed by running an aliquot on a 1% agarose gel.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RNA (2 μg) was reverse transcribed using One Step System (Life Technologies) according to manufacturer's recommendations, adding a step of DNase treatment. Briefly, 2 μg of total RNA was incubated with DNase (RNase free), 1 U in 10 μl of the appropriate buffer solution, for 15 min at rt, adding 1 μl of 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and heating at 65°C for 10 min to stop the reaction. This mixture was used for reverse transcriptase (RT), adding 25 μl of buffer 2X (0.4 mM of each dNTP, 2.4 mM MgSO_4), 1 μl RT/thermus aquaticus polymerase mixture, MgCl_2 , CB1RR antisense primer: 5'-atgctgttgctagaggctg-3' (10 μM , 1 μl), and water to adjust to 50 μl . RT was performed at 42°C for 30 min and stopped by heating 5 min at 94°C . Polymerase chain reaction (PCR) conditions were as follows: CB1RR sense primer, 5'-catcatcatccacagctcag-3'; CB1RR antisense primer, 5'-atgctgttgctagaggctg-3'; 33 cycles; denaturing, 45 s, 94°C ; annealing, 45 s, 53°C ; and elongation 1 min, 72°C , as previously described (Martinez-Vargas et al. 2003). We also amplified cyclophilin cDNA to assess RNA quality. We used primers, 5'-agacgccgctgtctcttttcg-3' and 5'-ccacacagtcggagatgggtgac-3', as previously described (Martinez-Vargas et al. 2003). In all assays, RNA samples without RT were run to exclude DNA contamination.

To evaluate the significant changes of the CB1R (protein and mRNA) throughout the day, the mean value of the protein amount of each rat for each time point was calculated and compared against the mean of an arbitrarily chosen point in the curve (0900 hours).

Immunohistochemistry

Naive rats were deeply anesthetized and transcardially perfused at two time points of the dark–light cycle (0100 and 1300 hours; $N=5$ rats per point). The brains were removed and processed for immunohistochemistry. All sections were processed at the same time and under the

same conditions. Coronal sections (50 μm) were cut by means of a cryostat. Sections were collected, one out of five, and were selected with reference to Paxinos and Watson's (1986) atlas. Tissue sections were incubated at rt with 0.075% H_2O_2 in PBS for 20 min to block the endogenous peroxidase. Then, sections were blocked in 5% normal goat serum/PBS with 0.3% Triton X-100 (TPBS). Upon completion of this part of the procedure, sections were incubated for 48 h at 4°C with CB1R antibody (Santa Cruz, CA, USA; 1:100 in TPBS). Bound antibodies were revealed by using the avidin–biotin peroxidase complex method (Vector Laboratories). Once sections were mounted and prepared, a photograph of each was taken under the exact same parameters of amplification, illumination, and contrast. Analysis of the CB1R immunoreactivity was performed in the dorsolateral region of the striatum and in the granular layer of the dentate gyrus (DG), CA1 and CA3 hippocampal regions. Each region was referred to a cell-free area (hippocampus–stratum radiatum and striatum–corpus callosum) in the same section to correct against background.

Statistical analyses

For the time performance and total errors in the BM, a two-way analysis of variance (ANOVA) test was used (treatment X day of training); Student–Newman–Keuls method was used to conduct pair-wise comparisons among the groups. Strategy was analyzed using a two-way ANOVA test (treatment X strategy); Student–Newman–Keuls method was used as post hoc test. All treatments in the hippocampus were analyzed together, but independently from treatments in the striatum. Distribution of errors was analyzed with a one-way ANOVA and all pair-wise multiple comparison procedures (LSD). Distance was analyzed using one-way ANOVA on ranks and Dunn's method as post hoc test. Significant differences for the CB1R immunohistochemistry, RT/PCR, and Western blot were obtained by using a one-way ANOVA test and a Bonferroni post hoc test. All analyses were performed considering $p < 0.05$ as statistically significant.

Results

Intrahippocampal administration of ANA and AM251

There was a significant effect of day of training for all treatments during the light and dark phase of the cycle that reflected the decrease in the time required to solve the maze and the total errors along the sessions (Fig. 2a, Time Light $F=40.523$, $p < 0.001$; Time Dark $F=43.232$, $p < 0.001$; Fig. 2b, Errors Light $F=5.994$, $p < 0.001$; Errors Dark $F=8.535$, $p < 0.001$). Even in this condition, there was no effect

of treatment on time of performance or total errors during the light or dark phase (Fig. 2a,b).

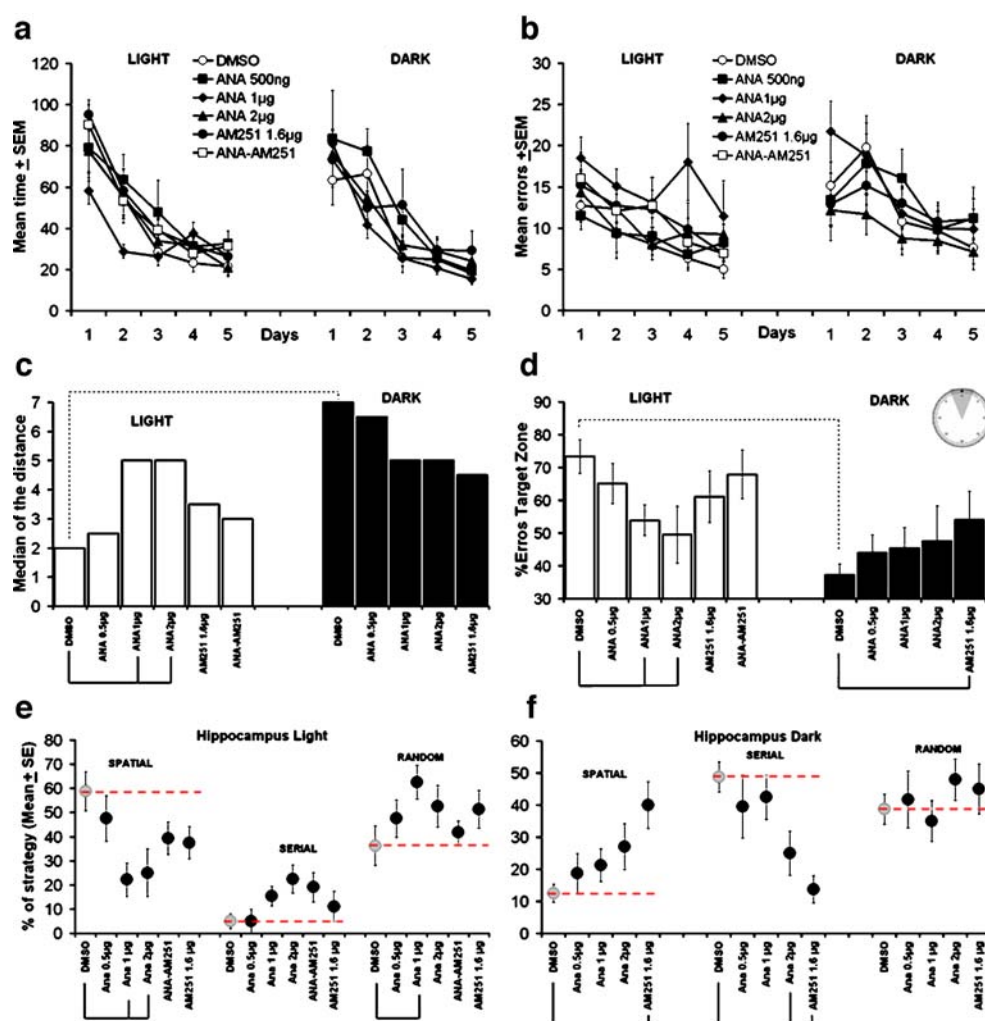
Our results indicate that rats receiving the vehicle and training at 0100 or at 1300 hours used a similar amount of time to solve the BM (Fig. 2a), albeit using different strategies (Fig. 2e, f). In all figures, where strategies are illustrated, data are presented as the mean value of the last 2 days of training, when the performance time reaches the lowest values. Those rats trained at 1300 hours (light phase) learned to solve the BM using a spatial strategy with respect to rats trained at 0100 hours ($p < 0.001$). In addition, the median of the distance was significantly shorter during the light than during the dark phase (Fig. 2c; between groups $F=5$, $p < 0.05$), the percentage of errors within the target zone was significantly higher (Fig. 2d; $p < 0.001$). In contrast, those rats trained at 0100 hours (dark phase) exhibited a serial strategy with respect to rats trained at 1300 hours (Fig. 2f); consistently, the median of the distance was far from the target hole (Fig. 2c), and the percentage of errors on the target area was lower.

As shown in Fig. 2, significant differences emerged between groups with respect to the use of different strategies depending on the light–dark cycle (Treatment x Strategy $F=10.223$, $p < 0.001$). Particularly ANA1 μg and ANA2 μg administered during the light phase significantly decreased spatial strategy (ANA1 μg $p < 0.001$, ANA2 μg $p=0.003$). ANA1 μg significantly increased random strategy ($p=0.009$; Fig. 2e). Concurrently, the median of the distance was located significantly far from the target hole (Fig. 2c; between groups $F=5$, $p < 0.001$; Cont vs ANA1 $p < 0.05$; Cont vs ANA2 $p < 0.05$), and the distribution of errors in the target zone decreased (Fig. 2d; between groups $F=3.992$, $p < 0.001$; Cont vs ANA1 $p=0.015$; Cont vs ANA2 $p=0.021$). No effects of ANA0.5 μg were detected at 1300 or 0100 hours on strategy (Fig. 2f), distance (Fig. 2c), or distribution of errors (Fig. 2d). These data indicate that rats under higher doses of ANA loose their ability to exhibit a spatial strategy.

During the dark phase, no significant effect of ANA was detected on strategy (Fig. 2f), distance (Fig. 2c), or distribution of errors (Fig. 2d).

The effect of ANA1 μg on spatial strategy during the light phase was prevented by the administration of the CB1R antagonist AM251; no significant differences were detected against control group in strategy, (Fig. 2e), distance (Fig. 2c), or distribution of errors (Fig. 2d). The same dose of AM251 used to block the effects of ANA produced no effects when administered alone during the light phase of the cycle (Fig. 2a,c,d,e); however, during the dark phase, it decreased significantly the expression of the serial strategy and increased spatial strategy (Fig. 2e; serial $p < 0.001$, spatial $p=0.001$); in agreement with this,

Fig. 2 Intrahippocampal administration of ANA (dose-response curve), ANA+AM251, and AM251. Time of performance (a) and total errors (b) during the light and dark phase of the cycle. Distance with respect to the target-hole during the light (white bars) and dark (black bars) phase of the cycle (c). d Percentage of errors inside the target zone (dashed area in the maze inset on the right). Comparison of strategies between control and experimental groups during the light (e) and dark (f) phase of the cycle. Significant differences are indicated by lines under each plot; dotted lines in c and d represent differences between control groups in light and dark cycle



the distribution of errors was also increased in the target area (Fig. 2d; $p=0.039$).

Intrastriatal administration of ANA and AM251

All treatments during the light and dark phase of the cycle caused a significant effect on the day of training that reflected the decrease in the time to solve the maze and the total number of errors along the sessions (Fig. 3a, Time Light $F=28.976$, $p<0.001$; Time Dark $F=39.449$, $p<0.001$; Fig. 3b, Errors Light $F=5.004$, $p<0.001$; Errors Dark $F=8.130$, $p<0.001$). There was no effect of treatment on time of performance or total errors during the light or dark phase (Fig. 3a,b). No differences were detected among treatments regarding strategies, distance, and distribution of errors during the light phase.

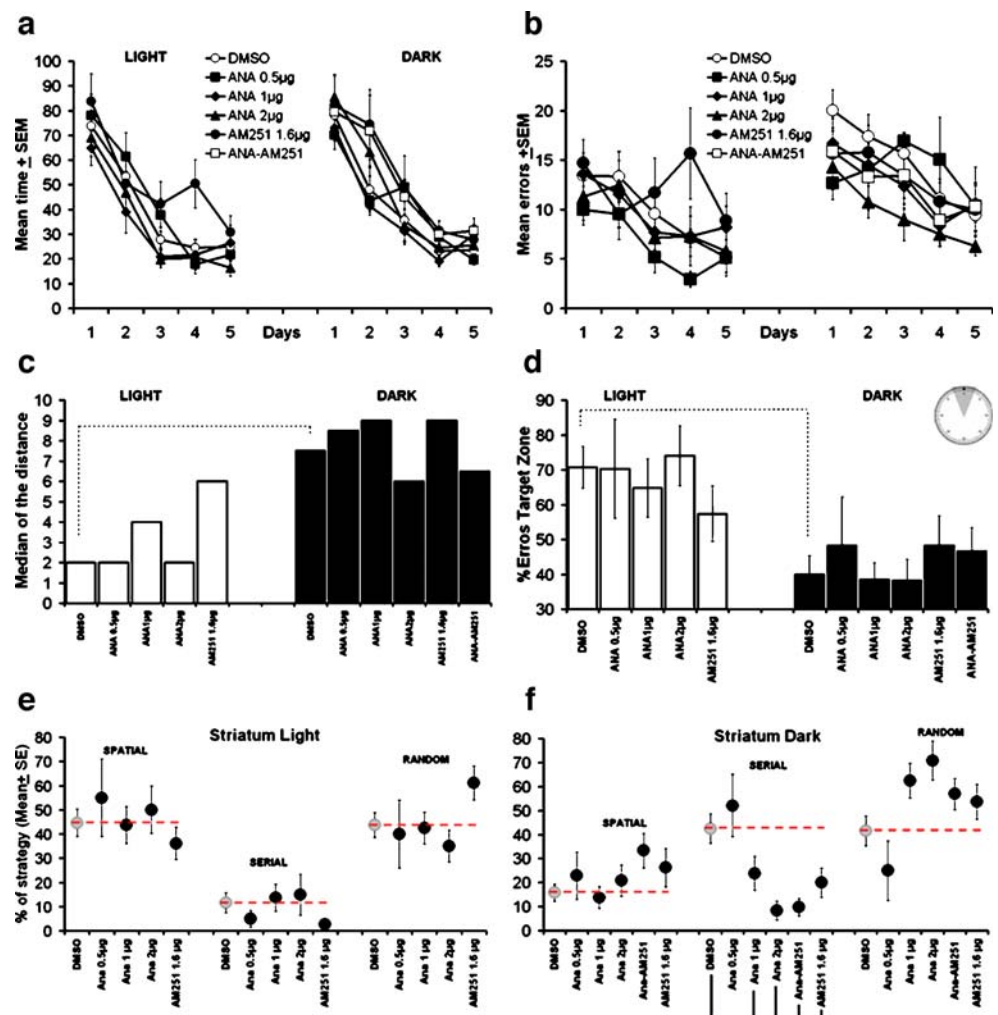
On the other hand, during the dark phase of the cycle, the serial strategy was significantly decreased by all treatments (ANA1 μ g, $p=0.016$; ANA2 μ g, $p=0.010$; ANA-AM251, $p=0.002$; AM251, $p=0.016$) except with

ANA0.5 μ g ($p=0.321$) as illustrated in Fig. 3f. No changes were observed on random or spatial strategy (Fig. 3f). In this case, it is again remarkable that the effect of ANA administration was effective only in one phase of the cycle (dark phase). Another surprising result is that the ANA effect on behavior during the dark phase was not reversed by AM251 administration (Fig. 3f). In this experiment, the combination ANA-AM251 and AM251 alone also decreased serial strategy. These results suggest that activation, as much as inactivation, of the cannabinergic system affects striatal functionality, and this effect depends on the light-dark cycle.

Intrastriatal and intrahippocampal noncontingent administration of ANA

A group of rats was implanted in the hippocampus and trained during the light phase of the cycle, while another group was implanted in the striatum and trained during the dark phase. ANA1 μ g was injected 2 h after (ANA1 μ g/2ha)

Fig. 3 Intrastratial administration of ANA, ANA+AM251, and AM251. Time of performance (a) and total errors (b) during the light and dark phase of the cycle. Distance with respect to the target-hole during the light (white bars) and dark (black bars) phase of the cycle (c). d Percentage of errors inside the target zone (dashed area in the maze inset on the right). Comparison of strategies between control and experimental groups during the light (e) and dark (f) phase of the cycle. Significant differences are indicated by lines under each plot; dotted lines in c and d represent differences between control groups in light and dark cycle



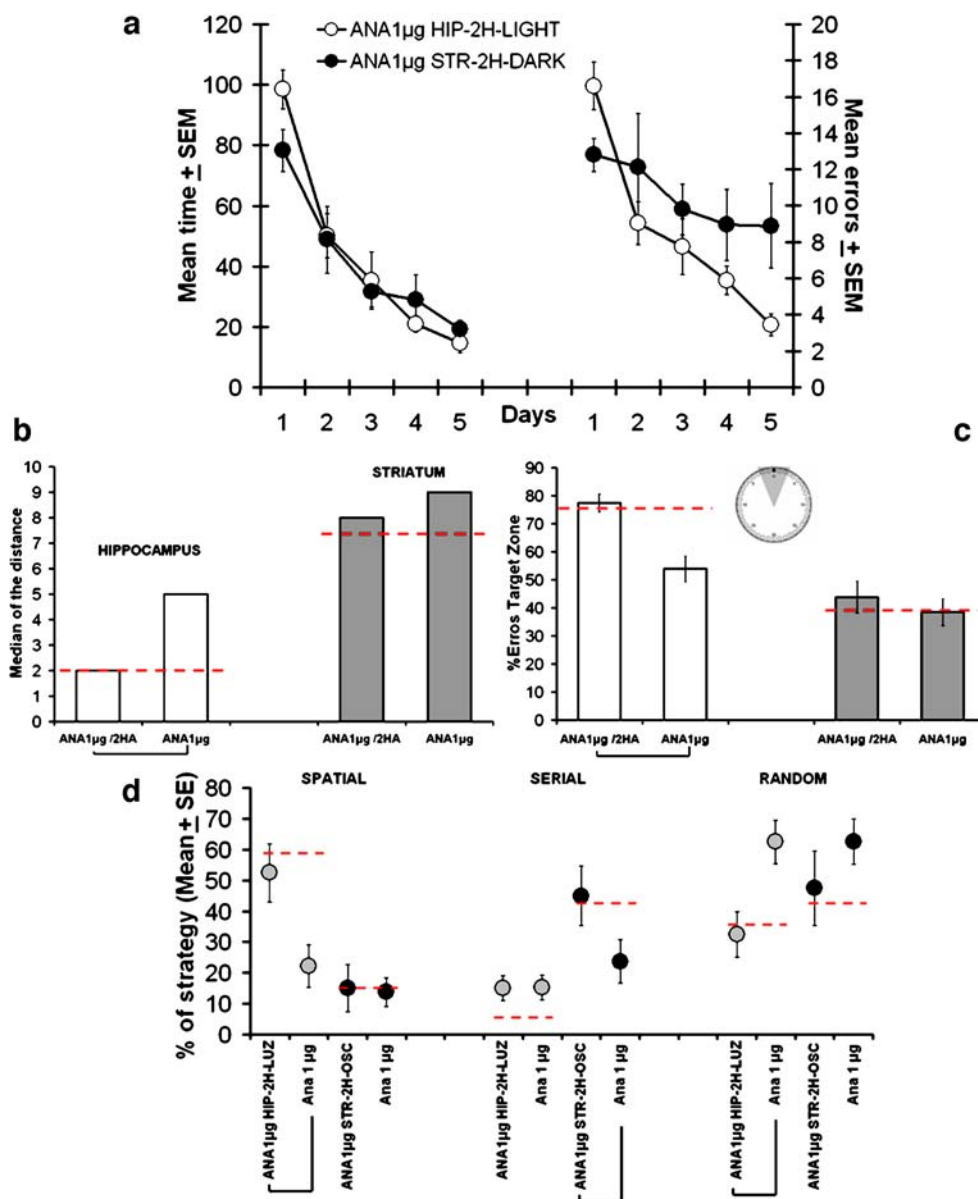
the end of each session every day of training, except on the fifth one. We decided to use only these groups because the main effects of ANA in the hippocampus were observed during the light phase of the cycle, and in the striatum during the dark phase. Data obtained from this group were compared against the control group and the group of ANA1 μ g injected immediately after the end of each session. Groups trained and receiving ANA1 μ g/2ha exhibited a normal learning curve that reflected the decrease in the time required to solve the maze and the total number of errors along the sessions (Fig. 4a; Hippocampus: Time $F=23.763$, $p<0.001$; Errors $F=5.205$, $p<0.001$; Striatum: Time $F=21.711$, $p<0.001$; Errors $F=4.704$, $p=0.001$). All the differences that we had observed in rats injected with ANA immediately after the training were missing in these rats injected 2 h after the end of the session, in both the hippocampus in the light phase and the striatum in the dark phase, as depicted in Fig. 4b,c, and d (Hippocampus: Distance ANA1 μ g/2ha vs ANA1 μ g, $DifofRank=38.394$, $p<0.05$; ANA1 μ g/2ha vs Cont, $DifofRank=3.252$, $p>0.05$; Dist.of.Errors ANA1 μ g/2ha vs ANA1 μ g, $p=0.042$; ANA1 μ g/2ha vs Cont $p=0.664$; Spatial ANA1 μ g/2ha

vs ANA1 μ g $p<0.001$; ANA1 μ g/2ha vs Cont $p=0.448$; Serial ANA1 μ g/2ha vs ANA1 μ g, $p=0.967$, ANA1 μ g/2ha vs Cont $p=0.252$; Random ANA1 μ g/2ha vs ANA1 μ g, $p=0.003$; ANA1 μ g/2ha vs Cont, $p=0.649$; Striatum Distance between groups $F=2$, $p=0.448$; Dist.of.Errors between groups $F=0.233$, $p=0.774$; Spatial ANA1 μ g/2ha vs ANA1 μ g, $p=0.913$; ANA1 μ g/2ha vs Cont, $p=0.939$; Serial ANA1 μ g/2ha vs ANA1 μ g, $p=0.043$, ANA1 μ g/2ha vs Cont, $p=0.818$; Random ANA1 μ g/2ha vs ANA1 μ g, $p=0.123$; ANA1 μ g/2ha vs Cont, $p=0.878$).

CB1R expression

Expression of the CB1R protein in the hippocampus underwent changes along the 24 h, specifically 1300 hours, was significantly different from 0100 hours ($p<0.001$) and 0500 hours ($p<0.009$), while remaining unchanged in the striatum (Fig. 5a). On the other hand, expression of the CB1R mRNA showed an important variation in the hippocampus, specifically 2100 hours was significantly different from 1700, 1300, 0900, and 05:00 hours ($p<0.001$) while remaining unchanged in the striatum (Fig. 5b). The

Fig. 4 Noncontingent administration of ANA into the hippocampus and striatum (ANA1 μ g/2ha). **(a)** Performance time (*left*) and total errors (*right*). **(b)** Distance with respect to the target-hole and percentage of errors inside the target zone **(c)** for rats trained under intrahippocampal ANA during the light phase (*white bars*) and intrastriatal ANA during the dark phase (*gray bars*). **(d)** Strategies for rats trained under intrahippocampal ANA during the light phase (*clear circles*) and intrastriatal ANA during the dark phase (*dark circles*). Dotted lines represent the median and means for the control group. No effect is observed when ANA is administered 2 h after the training with respect to control, but when compared against ANA immediately after training, significant differences can be observed. Significant differences are indicated by lines under each plot



immunohistochemistry assay revealed significant differences in the dorsolateral striatum ($p < 0.023$) and DG ($p < 0.005$), whereas CA1 and CA3 did not change (Fig. 6).

Discussion

Our results indicate that rats learned to solve the BM by selecting one of two strategies, depending on the light–dark cycle, that is, spatial during the light and serial during the dark phase (Figs. 2 and 3f). However, the capacity to solve the maze remained unchanged because rats utilized a similar time to solve the task (Figs. 2 and 3a), whether they were performing during the dark or the light phase of the cycle. This idea was previously put forth in different tasks by Folkard in humans (Folkard 1975, 1979) and by

Yanovski in rats (Yanovski et al. 1986). Based on the extensive literature supporting the involvement of the hippocampus in the control of spatial strategies and of the striatum in the control of procedural strategies (Packard and McGaugh 1992, 1996; White and McDonald 2002; Packard and Teather 1998; Packard and Knowlton 2002) such as the serial one, these data suggest that these two brain structures take control, one at the time, of the way the subject approaches the information depending on the hour of the day.

We are providing two lines of evidence to support the notion that the cannabinergic system is implicated in the change of strategies, depending on the light–dark cycle. First, we have shown by three different techniques that the expression of CB1R in the hippocampus changes depending on the light–dark cycle, while the striatum is more

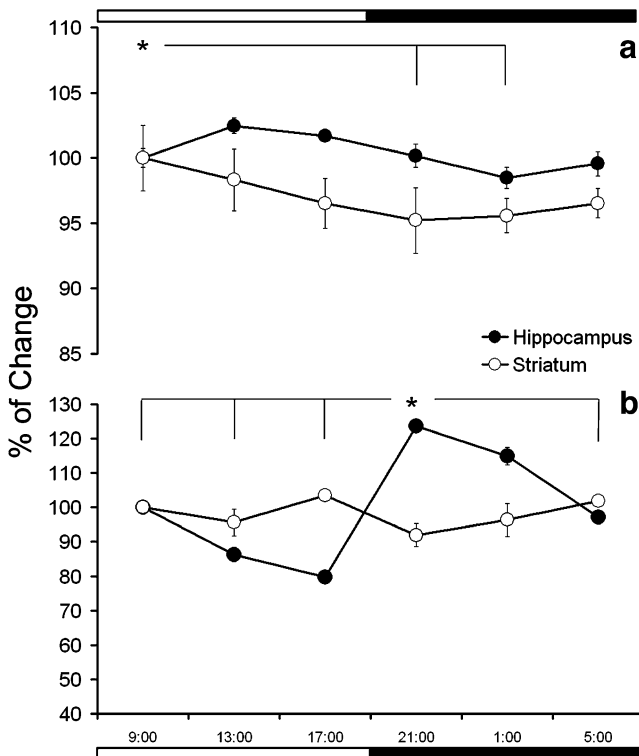


Fig. 5 CB1R protein expression in the hippocampus and striatum during the light–dark cycle (**a**). Mean \pm SEM of densitometry obtained from the 53-kDa band. In the hippocampus, a significant increase is observed during the light phase of the cycle ($p < 0.05$). In the striatum, the highest concentration occurs at 0900 hours, while the lowest occurs at 2100 hours, albeit the changes are not significant (note that the y axis does not start at the origin). CB1R mRNA expression in the hippocampus and striatum during the light–dark cycle (**b**). Histogram of densitometry obtained from the mRNA band. There is an increase in the hippocampus during the light phase of the cycle ($p < 0.05$). In the striatum, the concentrations remained unchanged during the cycle. Curves are expressed as a double plot for a better appreciation of the cycle

stable. These data suggest that the switching of strategies might result from the activity of the cannabinergic and, potentially, of other inhibitory systems. However, these variations in the cannabinergic system may be crucial in the hippocampus but not in the striatum that, as aforementioned, remains stable. This is not the first time the cannabinergic system is described as showing diurnal variations. Valenti et al. (2004) and Murillo-Rodríguez et al. (2006) have shown that 2-AG and ANA fluctuate and, more importantly, these authors reported that 2-AG concentration is higher in the hippocampus and striatum during the light phase of the cycle, whereas ANA is higher during the dark phase. This is an intriguing condition that deserves further investigation. We have, at present, no data to support any comments to this respect. However, these findings prompt us to clarify the participation of 2-AG and its possible interaction with ANA in memory consolidation.

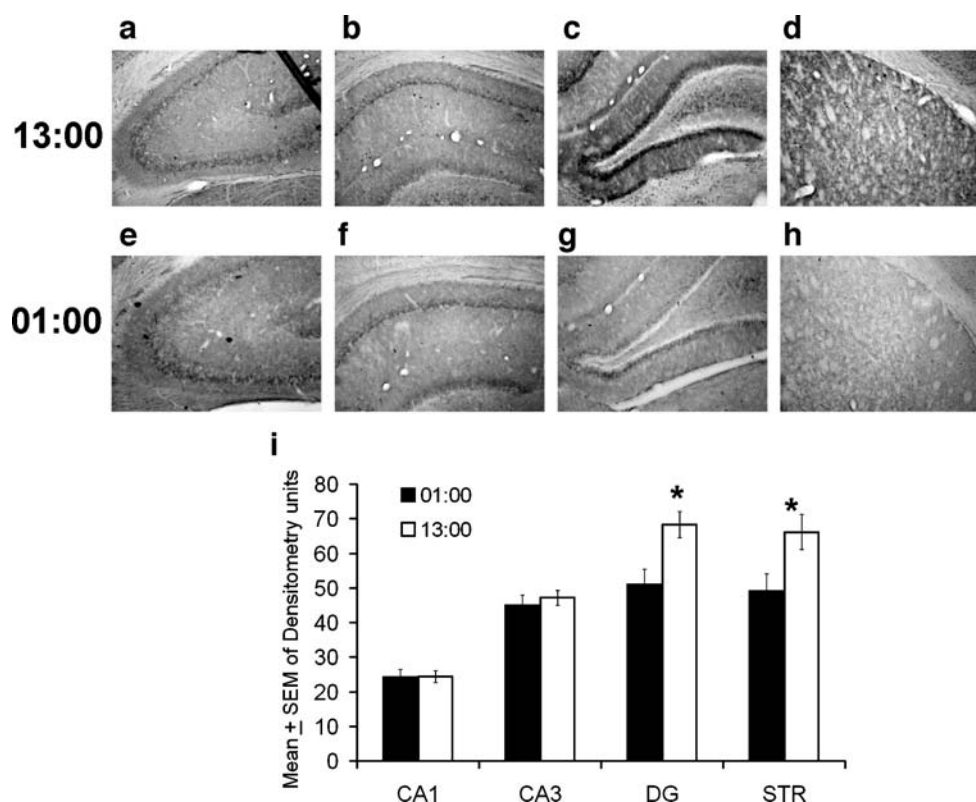
Second, changes in CB1R expression in the hippocampus are reflected on behavior, as can be implied from the fact that administration of ANA causes dose-dependent effects only during the light phase of the cycle, when CB1R expression is higher, and that these effects are blocked by the antagonist AM251 (Fig. 2). The latter is correlated with a decreased CB1R expression. This idea is complemented by the fact that AM251 administered alone during the dark phase in the hippocampus facilitates the expression of a spatial strategy (Fig. 2), suggesting that the CB1 receptor is implicated in blocking the expression of spatial strategy during the dark phase. This evidence and the fact that ANA does not show significantly different effects during the dark phase of the cycle also sustain the hypothesis that the differential expression of CB1R is physiologically significant for the brain in spite of what seem to be subtle changes in CB1R expression.

Numerous studies have suggested that the distribution of the cannabinergic receptor in the hippocampus is predominantly presynaptic in both GABAergic (Katona et al. 1999, 2000; Hoffman and Lupica 2000; Wilson and Nicoll 2001; Alger 2004) and glutamatergic terminals (Shen et al. 1996; Ameri et al. 1999; Alger 2002; Katona et al. 2006). In the case of the hippocampus, administration of ANA during the light phase (higher CB1R concentrations) would lead to an imbalanced modulation of glutamate and GABA release, two important systems regulating the function of the hippocampus. Very likely, during the dark phase, to reach this imbalance would probably require higher doses of the cannabinoid agonist. In any case, the hippocampus showed a different sensitivity to cannabinoids depending on the light–dark cycle.

Striatal administration of ANA, AM251, or ANA-AM251 resulted in a decrease in the serial strategy and an increase in the random behavior during the dark phase (Fig. 3f). This effect may not be seen during the light phase because, as indicated by the control groups, the spatial strategy is dominant in this phase, and serial strategy is less frequently exhibited (Figs. 2 and 3). The relative stable CB1R concentration in the striatum supports the hypothesis that the hippocampus might be responsible for the change of strategy, in the sense that if the hippocampus were active, it would lead the behavior, i.e., the strategy would be spatial; whereas if the hippocampus were less active, then the striatum would lead the behavior, i.e., the strategy elected would be serial.

The fact that all our cannabinergic manipulations on the striatum brought about changes in behavior may be explained by the fact that the cannabinergic system is indispensable for striatal function, as indicated by studies on striatum's long-term plasticity (long-term depression LTD) (Gerdeman et al. 2002). In this structure, strong evidence supporting the presence of the CB1R in both

Fig. 6 Representative sections for the immunohistochemistry in CA3 (**a**, **e**), CA1 (**b**, **f**), DG (**c**, **g**), and dorsolateral striatum (**d**, **h**) at 1300 hours (light phase) and 0100 hours (dark phase). Note the different expressions of CB1R in the DG (**c**, **g**) and the striatum (**d**, **h**). **i** Histogram of densitometry obtained from each structure at 1300 vs 0100 hours



glutamatergic and GABAergic presynaptic terminals has been found, as well as in some postsynaptic terminals (Szabo et al. 1998; Fusco et al. 2004; Huang et al. 2001; Köfalvi et al. 2005). In the striatum, as well as in other structures, the cannabinergic system is implicated in neurotransmitter release modulation, i.e., GABA or glutamate-release via a CB1R-dependent mechanism (Köfalvi et al. 2005). Affecting the striatal cannabinergic system by blocking or enhancing CB1R activity would lead to an imbalance in striatal function, as this receptor has been proposed as fundamental for it.

In the first part of our study, we performed injections immediately after the training, pursuing to describe an effect in memory consolidation. Such an effect was partially confirmed by the fact that the treatments effectively modified the behavior in these conditions. Nevertheless, this does not exclude the possibility that ANA is affecting permanently the functionality of either the hippocampus or the striatum. The noncontingent administration of ANA confirms that ANA affects the early stages of consolidation of memory, as no effects on behavior were observed under these conditions.

We propose that the interaction between the hippocampus and the dorsolateral striatum favoring either structure to control behavior (White and McDonald 2002) results from the adaptation to the light–dark cycle. This interaction is modified by the direct administration (to the hippocampus or to the striatum) of ANA in a light–dark cycle-dependent way. It is remarkable that such a selection of strategy is an

adaptive response to the presence or absence of natural light. As it has been suggested by others (Folkard 1975, 1979), the subject's efficiency to handle information does not depend only on his capacity to store and organize it, but also on his ability to exhibit one or another strategy to acquire it. In the case of our rats, they preferred to use a spatial strategy during the light and a serial strategy during the dark phase of the cycle. We insist on remarking that the strategy selection depends on the cycle rather than on light availability, as we provided the rats with ambient illumination during BM performance, regardless of the phase of the cycle. We would like to interpret these data suggesting that the physiological condition of the brain is tightly related to the natural changes of environmental illumination (light–dark cycle), but not to fortuitous light availability (as the light we provided for about half an hour during the BM training).

We have to admit that it has been largely demonstrated that light pulses of 100–400 lx induce a shift in phase and period of circadian rhythms in hamsters and mice, particularly when applied to animals under continuous darkness (advances or delays depending on the time of application and duration of the pulse, from 1 to 18 h; Comas et al. 2006). However, scientific literature describing the effect of light pulses in rats, in particular, Wistar albino rats, is inexistent. For this reason, ambient light was maintained at about 50 lx during the 20 min of the experimental session. This pulse of light is below the typical level of stimulation. In addition, the studies

showing advances or delays in circadian rhythms have been conducted on constant darkness; hence, circadian rhythms are in “free running.” In our experimental conditions, rats were maintained under a light–dark cycle (12:12); thus, they are synchronized to this exogenous rhythm. Hence, the 50-lx stimulation doubtfully affected the circadian rhythm.

In our study, we describe a role of endocannabinoids as part of the modulating system, whose function is to switch from one strategy to the other to solve the problem efficiently.

Acknowledgment This research was supported by Grant 49797 from CONACYT to OPG. PER was supported by a fellowship from CONACYT and DGAPA-UNAM.

References

- Alger BE (2002) Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68:247–286
- Alger BE (2004) Endocannabinoids: getting the message across. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8512–8513
- Ameri A (1999) The effect of cannabinoids on the brain. *Progress Neurobiol* 58:315–348
- Ameri A, Wilhelm A, Simmet T (1999) Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *J Pharm* 126:1831–1839
- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurobiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:74–104
- Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V (2005) The endocannabinoid signaling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81:224–238
- Chaudhury D, Colwell CS (2002) Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res* 133:95–108
- Comas M, Beersma DG, Spoelstra K, Daan S (2006) Phase and period responses of the circadian system in mice (*Mus musculus*) to light stimuli of different duration. *J Biol Rhythms* 21:362–372
- Egertova M, Elphik MR (2000) Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB₁. *J Comp Neurol* 422:159–171
- Folkard S (1975) Diurnal variation in logical reasoning. *Br J Psychol* 66:1–8
- Folkard S (1979) Time of day and level of processing. *Mem Cogn* 7:272–274
- Fusco FR, Martorana A, Giampa C, De March Z, Farini D, D’Angelo V, Sancesario G, Bernardi G (2004) Immunolocalization of CB₁ receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53:159–167
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5:446–451
- Hampson RE, Deadwyler SA (1998) Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol Dis* 5:474–482
- Hao S, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM (2000) Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur J Pharmacol* 392:147–156
- Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, McDonald MP (2006) Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learn Mem* 13:809–819
- Hoffman AF, Lupica CR (2000) Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA_A synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 20:2470–2479
- Huang CC, Lo SW, Hsu KS (2001) Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol* 532:731–748
- Katona I, Sperl agh B, Sik A, K ofalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB₁ cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544–4558
- Katona I, Sperl agh B, Magloczky Z, Santha E, K ofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF (2000) Gabaergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100:797–784
- Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 26:5628–5637
- K ofalvi A, Rodriguez RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, Sperlag B (2005) Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunohistochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 16:2874–2884
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lichtman AH, Martin BR (1996) Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology* 126:125–131
- Martinez-Gonzalez D, Bonilla-Jaime H, Morales-Otal A, Henriksen SJ, Velazquez-Moctezuma J, Prospero-Garcia O (2004) Oleamide and anandamide effects on food intake and sexual behavior of rats. *Neurosci Lett* 364:1–6
- Martinez-Vargas M, Murillo-Rodriguez E, Gonzalez Rivera R, Landa A, Mendez-Diaz M, Prospero-Garcia O, Navarro L (2003) Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience* 117:197–201
- May CP, Hasher L, Foong N (2005) Implicit memory, age, and time of day: paradoxical priming effects. *Psychol Sci* 16:96–100
- Murillo-Rodriguez E, Sanchez-Alavez M, Navarro L, Martinez-Gonzalez D, Drucker-Colin R, Prospero-Garcia O (1998) Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res* 812:270–274
- Murillo-Rodriguez E, Giordano M, Cabeza R, Henriksen SJ, Mendez-Diaz M, Navarro L, Prospero-Garcia O (2001) Oleamide modulates memory in rats. *Neurosci Lett* 313:61–64
- Murillo-Rodriguez E, Desarnaud F, Prospero-Garcia O (2006) Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci* 79:30–37
- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25:563–593
- Packard MG, McGaugh JL (1992) Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci* 106:439–446
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72
- Packard MG, Teather LA (1998) Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem* 69:163–203
- Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic, San Diego
- Pettit DAD, Harrison HP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA (1998) Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Res* 51:391–402

- Ralph MR, Ko CH, Antoniadis EA, Seco P, Irani F, Presta C, McDonald RJ (2002) The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behav Brain Res* 136:179–184
- Shen M, Pieser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonist inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16:4322–4334
- Soria-Gomez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, Cisneros M, Petrosino S, Navarro L, DiMarzo V, Propsero-Garcia O (2007) Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *Br J Pharmacol* 151:1109–1116
- Szabo B, Dörner L, Pfreundtner C, Nörenberg W, Starke K (1998) Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 85:395–403
- Tsuo K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1R receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393–411
- Valenti M, Vigano D, Cascio MG, Rubino T, Steardo L, Prolaro D, Di Marzo V (2004) Differential diurnal variations of AEA and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Mol Life Sci* 61:945–950
- Varvel SA, Hamm RJ, Martin BR (2001) Differential effects of delta 9-THC on spatial reference and working memory in mice. *Psychopharmacology* 157:142–150
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588–592
- White NM, McDonald RJ (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77:125–184
- Yanovski JA, Adler NT, Gallistel CR (1986) Does the perception of reward magnitude of self-administered electrical brain stimulation have a circadian rhythm. *Behav Neurosci* 100:888–893

10.2 Anexo 2

El anexo 2 es el artículo que conjunta los resultados de los experimentos de extinción y el sistema canabinérgico en el estriado y el hipocampo. Fue aceptado en Abril del 2008 en la revista “Neurppharmacology”

Referencia:

Rueda-Orozco PE, Montes-Rodriguez CJ, Soria-Gomez E, Prospero-García O. Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. *Neuropharmacology*. En prensa.

Manuscript Number: NEUROPHARM-D-08-00091R1

Title: IMPAIRMENT OF ENDOCANNABINOIDS ACTIVITY IN THE DORSOLATERAL STRIATUM
DELAYS EXTINCTION OF BEHAVIOR IN A PROCEDURAL MEMORY TASK IN RATS

Article Type: Research Paper

Section/Category: Behaviour

Keywords: Extinction, CB1 Receptor, Cannabinoids, Striatum, Hippocampus,
Procedural Memory.

Corresponding Author: Dr. Pavel Ernesto Rueda-Orozco,

Corresponding Author's Institution: Facultad de Medicina, UNAM

First Author: Pavel Ernesto Rueda-Orozco

Order of Authors: Pavel Ernesto Rueda-Orozco; Corinne J Montes-Rodriguez, Ph.D.;
Edgar Soria-Gomez, Ph.D.; Monica Mendez-Diaz, Ph.D.; Oscar Prospero-Garcia, M.D.,
Ph.D

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Abstract

The dorsolateral striatum (DLS) has been implicated in the learning of habits and procedural memories. Extinction of this kind of memories has been poorly studied. The DLS expresses high levels of the cannabinergic receptor one (CB1), and, lately, it has been suggested that the activation of CB1 in this structure is indispensable for long-term depression (LTD) development. We performed experiments in a T-maze and evaluated the effects of intrastriatal and intrahippocampal administration of the CB1 antagonist AM251 on extinction and on c-Fos expression. We also administered anandamide to evaluate if an artificial increase of endocannabinoids facilitates extinction. Our results indicate clearly a dose response blockade of extinction induced by AM251 injected into the striatum but a facilitation of extinction when administered into the hippocampus. Anandamide did not induce any observable changes. AM251 effects were accompanied by an increase in c-Fos immunoreactivity in the DLS and its decrease in the hippocampal region, suggesting that the activation of CB1 in the striatum is necessary for the extinction of procedural memories. These findings could be important in some neurological conditions, such as obsessive compulsive disorder in which striatal activity seems to be abnormal.

IMPAIRMENT OF ENDOCANNABINOIDS ACTIVITY IN THE DORSOLATERAL STRIATUM DELAYS EXTINCTION OF BEHAVIOR IN A PROCEDURAL MEMORY TASK IN RATS

Cannabinergic System and Procedural Memories

Pavel E. Rueda-Orozco Ph.D., Corinne J. Montes-Rodriguez Ph.D., Edgar Soria-Gomez Ph.D., Mónica Méndez-Díaz Ph.D., Oscar Prospéro-García M.D., Ph.D.

Grupo de Neurociencias, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UNAM. Mexico, D. F. 04510, Mexico.

Correspondence:

Dr. Pavel E. Rueda-Orozco

Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UNAM

Apdo. Postal 70-250, México, D. F. 04510

México

Telephone: (5255) 5623 2509

Fax: (5255) 5623 2395

E-mail: pavel.rueda@gmail.com

Abstract

The dorsolateral striatum (DLS) has been implicated in the learning of habits and procedural memories. Extinction of this kind of memories has been poorly studied. The DLS expresses high levels of the cannabinergic receptor one (CB1), and, lately, it has been suggested that the activation of CB1 in this structure is indispensable for long-term depression (LTD) development. We performed experiments in a T-maze and evaluated the effects of intrastriatal and intrahippocampal administration of the CB1 antagonist AM251 on extinction and on c-Fos expression. We also administered anandamide to evaluate if an artificial increase of endocannabinoids facilitates extinction. Our results indicate clearly a dose response blockade of extinction induced by AM251 injected into the striatum but a facilitation of extinction when administered into the hippocampus. Anandamide did not induce any observable changes. AM251 effects were accompanied by an increase in c-Fos immunoreactivity in the DLS and its decrease in the hippocampal region, suggesting that the activation of CB1 in the striatum is necessary for the extinction of procedural memories. These findings could be important in some neurological conditions, such as obsessive compulsive disorder in which striatal activity seems to be abnormal.

Keywords:

Extinction, CB1 Receptor, Cannabinoids, Striatum, Hippocampus, Procedural Memory.

Introduction

The existence of different memory systems has long been recognized (Milner et al. 1998; Packard and Cahill 2001; White and McDonald 2002; Squire 2004). Among the brain systems mostly studied in relation to memory are the hippocampal and striatal memory systems, responsible for spatial and procedural memories respectively (Packard et al. 1989; McDonald and White 1993), observing an interaction between these two systems. For example, the hippocampus is responsible for the expression of a spatial strategy during the first stages of training. Later on, it is substituted presumably by the striatum when the spatial strategy is switched to a procedural strategy (Packard et al. 1989; McDonald and White 1993; McIntyre et al. 2003; Chang and Gold 2003; Colombo et al. 2003). In this study we decided to evaluate the role of endocannabinoids in the dorsolateral striatum in the procedural memory and in the process of extinction.

The high expression of cannabinergic system components, such as receptors and ligands, in structures related to memory, like the hippocampus, amygdala, and basal ganglia (Tsuo et al. 1998; Petit et al. 1998; Egertova and Elphik 2000) has made this system a critical target for memory studies (Hampson and Deadwyler 1998; Murillo-Rodriguez et al. 2001; Rueda-Orozco et al. 2007; for a review see Castellano et al. 2003). Important advances have been achieved in relation to the cannabinergic system and hippocampal (Deadwyler et al. 1996; Sullivan 1999; Wilson and Nicoll 2001; Robbe et al. 2006), amygdala (Katona et al. 2001; Marcicano et al. 2002; Azad et al. 2004; Zhu et al. 2005), and striatal activity (Gerdeman et al. 2002; Kreitzer and Malenka 2007). Aside from the literature concerning memory and cannabinoids, a growing body of evidence suggests that one of the important functions of the cannabinergic system is its role in the process of extinction.

Extinction of memories has been largely studied in fear conditioning paradigms (for a review see Barad et al. 2006). Extinction has been considered to be a specific inhibitory learning that prevents the expression of a specific behavior without deleting it (for reviews see Rescorla 2001; Eisenhardt and Menzel 2007). Recently, the cannabinoid receptor one (CB1) has been implicated in the extinction of fear (Marcicano et al. 2002) and spatial memories (Pamplona et al., 2006; Varvel et al. 2007). One of the structures where the cannabinergic system might be exerting its effects in extinction processes is the striatum, in which CB1 is highly expressed (Tsuo et al. 1998; Petit et al. 1998; Egertova and Elphik 2000; Kofalvi et al. 2005). For example, it has been demonstrated that CB1 receptor activation is necessary for striatal LTD (Gerdeman et al. 2002; Robbe et al. 2002) and its failure to produce LTD may account for the development of neuropsychiatric conditions, such as Parkinson disease (Kreitzer and Malenka 2007). In this context, we have decided to explore the potential role of the striatal cannabinergic system in the extinction of procedural memories.

Methods

Animals

Wistar albino male rats (weight 250-300 g at the beginning of the experiment) were used for all experiments. They were housed individually in a temperature-

controlled environment with a 12-h light/dark cycle (lights on at 8:00 A.M.) and *ad libitum* access to water. Rats were housed individually 5 days before experimental procedures started.

Drugs

The CB1R antagonist AM251 was obtained from Cayman Chemical, anandamide was obtained from Sigma Aldrich. The AM251 concentrations were 0.4 μg (AM251-0.4), 1.6 μg (AM251-1.6), and 3.2 μg (AM251-3.2) dissolved in dimethyl sulfoxide (30%DMSO) in phosphate-buffer saline (PBS). Anandamide concentration was 1.0 μg in the same vehicle. Final volume for all injections was 1 μl . The concentration of anandamide was selected on the base of our previous study were this concentration was effective to impair the consolidation of memory in a different task (Rueda-Orozco et al, in press).

Surgery

Ten days before starting the experimental procedures, rats were implanted bilaterally under anesthesia (cocktail: ketamine 66 mg/kg + xylazine 0.26 mg/kg + acepromazine 1.3 mg/kg) with a couple of guide cannulae (23 gauge) directed to either the dorsolateral striatum (A=0.2, L=3.0, V=3.0, Fig 4 b) or the hippocampus (P=4, L=2.5, V=2.2, Fig. 4 a). The injector protruded 1 mm from the tip of the guide cannula. Three supporting stainless steel screws were implanted into the skull. Once the experiment was finished, brains were prepared for histological analysis with cresyl violet staining to verify the correct placement of the injector (Fig. 1 a and b)

Behavioral training

The behavioral apparatus was a home-made adaptation of the plus maze described in Packard and McGaugh (1996). The maze consisted of four identical arms (length x width x height, 60 x 12 x 15 cm) containing food dispensers at their ends; the center of the maze was a platform measuring 12 x12 cm. The maze was elevated 90 cm above the floor and located in the center of a testing room that contained extramaze cues. Cocoa-Krispies (Kellogg's) were used as reinforcement.

Ten days after the surgery rats were reduced to 85% of their free-feeding weight over 5 days and maintained at this weight throughout the experiment. Five days before starting the training, rats were manipulated and habituated to the maze (10 min per day). Approximately 4 g/day of food reward was delivered inside the maze during the habituation process. The next day, after attaining habituation, rats were trained to turn right or left (50% of the rats were trained to the left and 50% to the right) to obtain food reward located at the end of the arm (approx. 0.4 g). In this type of training, rats can use either a spatial strategy (go to the arm in a fixed position of the room) or a procedural strategy (turn right or left according to the situation) to obtain the reward (Pakard and McGaugh 1996; Chang and Gold 2003; McIntyre et al. 2003). Each trial started with the rat confined into the start box at the extreme of the start arm for 10 seconds. Once this time elapsed, the rat was released and allowed to explore the three arms until it found the reward or after 2 minutes had elapsed. Once the rat reached the end of the arm with the reward, the rat was confined until consuming it or after 45 s had elapsed. Entering into the unrewarded arm of the maze was considered as an incorrect trial. When rats entered into the incorrect arm, they were allowed to trace back to the reinforced

correct arm and then they were confined there and allowed to consume the reward. Ten trials per session (five sessions of training, one session per day), were performed for each rat, an approximate 35-s interval was allowed between trials. During this time, the rats were returned to their home cages and the maze was cleaned with chlorine solution to prevent odor cues.

At the end of the training, rats were subjected to two sessions of 10 extinction trials. In these trials, rats were placed into the start arm used during training but the reward was provided at the arm opposite to the one rewarded during training (for example, training: start arm north, rewarded arm west; extinction: start arm north, rewarded arm east). As in the training phase, trials were considered as incorrect when rats entered the unrewarded arm (rewarded arm during training) and they were also allowed to trace back to the rewarded arm (unrewarded arm during training). A schematic view of the training and extinction protocols can be seen in figure 1 c, and d. Vehicle or AM251 was given 5 minutes before starting both extinction sessions to affect cannabinergic transmission specifically during the extinction process. Finally, in order to insure the integrity of the motor control, the day after the last session of extinction, 15 rats were randomly selected to integrate three independent groups. Animals were trained to run for food reward into a corridor of 140cm length and 12 cm width allowing the rats to run without turns. Eight trials per rat were performed while animals were under vehicle or AM251 (3.2µg) or ANA (1µg).

Insert figure 1 about here

c-Fos Immunohistochemistry

Five groups of rats (n=5 per group) were used for immunohistochemistry. Groups were assigned as follows: group of food deprivation (85% of weight during five days, Control-0), group of first day of training (10 trials, Training-1) group of fifth day of training (50 trials of training in five days, Training-5), group of extinction (50 trials of training and 5 trials of extinction, Extinction), and group of extinction under AM251 (50 trials of training and 5 trials of extinction, AM-Extinction). Ninety minutes after the last trial in each group, rats were anaesthetized with sodium pentobarbital and perfused transcardially with 200 ml PBS and 200 ml 4% PFH. The time to kill the animals and proceed the collect the brains was determined according to previous literature showing that maximum peak of c-Fos expression is reached between 60 and 120 minutes after an event (Morgan and Curram, 1989). The brains were removed and processed for immunohistochemistry. Coronal sections (50 µm) were obtained by means of a cryostat. Sections were collected, one out of five, and were selected with reference to the Paxinos and Watson's atlas (1986). Immunohistochemistry was developed with the peroxidase-diaminobenzidine reaction. Briefly, tissue sections were incubated at room temperature with 0.075% H₂O₂ in PBS for 20 minutes to block the endogenous peroxidase. Then, sections were blocked in 5% normal goat serum/PBS with 0.3% Triton X-100 (TPBS). Upon the completion of this part of the procedure, sections were incubated for 24 h at 4°C with c-Fos antibody (Santa Cruz, CA, USA) (1:1000 in TPBS). Bound antibodies were revealed by using the avidin-biotin peroxidase complex method (Vector Laboratories). Sections were observed under a light microscope (Olympus BX41). Images were captured on a 12-bit digital camera (Evolution VF; MediaCybernetics) at a magnification of 10 x for cell-nuclei counting.

Analysis of the c-Fos immunoreactivity was performed in the dorsolateral region of the striatum and in the granular layer of the dentate gyrus (DG), CA1 and CA3 hippocampal regions. Images were displayed on a computer screen using the Image-Pro Plus software (MediaCybernetics), which allowed us to mark individual c-Fos immunoreactive (F-ir) cells. Counts of F-ir cells were obtained bilaterally from three brain sections for each region and averaged for subsequent analysis. Data on the analysis of the subregions of the hippocampus was performed as percentage of change with respect to the total number of F-ir cells of the hippocampus.

All behavioral training and killing of animals for c-Fos immunohistochemistry were performed between 12:00 and 15:00 (corresponding to the light phase of the cycle).

Statistical analyses

For the performance on the plus maze an index of correct responses was elaborated for each rat (correct trials/total trials). Index of correct responses were analyzed by means of a two-way ANOVA test (treatment X session of training); Bonferroni t-test was used to conduct multiple comparisons among groups. Significant differences for c-Fos immunohistochemistry and running speed were obtained by using a one-way ANOVA test and a Bonferroni post hoc test. Results are displayed as means \pm s.e.m. Additional Pearson correlation analysis was used to detect interactions between-structures and intra-structures. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Control group in the T maze

The first experiment was performed with the control group with no implant. This group would set the standard parameters of normal behavior and c-Fos activity of the rats acquiring and extinguishing the behavior. Repeated measures and the one-way ANOVA analysis revealed significant changes depending on the day of training, clearly delineating a learning curve, and indicating that rats improve their performance as the training progresses. In brief, session 1 was significantly different from the rest of sessions, including extinction 1 ($p < 0.001$ in all cases except against extinction 2 $p = 0.004$, and extinction 3 $p = 0.035$). No significant differences were observed between sessions 2 to 5, indicating that rats learned the task relatively fast. Data from extinction sessions were divided in blocks of five trials to better appreciate the trial in which the behavior becomes extinct. Extinction 1 (first 5 trials) was significantly different from all other sessions including training and extinction ($p > 0.001$ in all cases). These data indicate that the first 5 trials of extinction are critical since rats take only those trials to reach a high level of correct responses. We observed that, the first five trials of extinction are the ones in which the rats "realize" that the reinforced arm has changed. In the second five trials, the level of accuracy went back above the 0.8 index and no significant differences were observed when compared against sessions 2, 3, 4, or 5. After extinction 2, the high level of accuracy remained unchanged in extinction 3 and 4, indicating that extinction had been achieved (Fig. 2 a)

Control group c-Fos

The immunohistochemical assays reveal a significant increase in

immunoreactive cells in the dorsolateral striatum as a result of training. As shown in figure 2, there is a significant difference between day 0 and day 1 ($P=0.028$), and extinction session ($P=0.048$) but not with regard to day 5 (Fig. 2b). Analysis of the hippocampus (CA1, CA3, and DG together, Fig. 2c) indicates that there is also a significant increase in the number of positive cells, between day-0 and day-1, day-5 and the extinction session ($P<0.001$ in all cases). Significant differences also emerged between day 1 and day-5, and extinction session ($p<0.001$ in both cases). Comparison between day-5 and extinction session was also significant ($p<0.001$). The analysis of the hippocampal sub-regions failed to show significant differences in the DG among groups (Fig. 2d). On the other hand, CA3 (Fig. 2e) and CA1 (Fig. 2f) regions show significant differences between day-0 and day-5 (CA3 $P=0.001$; CA1 $P<0.001$), between day-0 and extinction session (CA3 $P<0.001$; CA1 $P<0.001$), and between day-0 and day-1 (CA1 $P=0.19$). A correlation analysis was performed considering the striatum, general activity of the hippocampus, CA1, CA3, and DG. The number of c-Fos-reactive cells corresponding to the first day of training reveals a significant correlation between CA1 and CA3 hippocampal regions. Interestingly, after the fifth day of training and besides the general increase of hippocampal activity no correlation between CA1 and CA3 was observed. After the first block of extinction trials, the correlation between CA1 and CA3 was regained. No correlation between the hippocampus and the striatum was observed. All correlations are summarized in Table 1.

Insert figure 2 about here

Insert table 1 about here

Striatal administration of AM251

Four groups of rats ($n=10$ per group) were used to construct a dose response curve of AM251 administered in the striatum. As shown in figure 3 a, no differences among groups were observed during the 5 days of training in which no drugs were given; nevertheless significant differences emerged during the extinction sessions. For a better appreciation of these differences we plotted the last training session and the extinction sessions on a different graph (Fig. 3 b). As aforementioned, no differences were observed among groups during training session 5. On extinction 1, no differences between control group, AM-0.4 and AM-1.6 were observed, nevertheless AM-3.2 was significantly different from the control group ($p=0.042$) and AM-0.4 ($p>0.001$). AM-0-04 was also significantly different from AM-1.6 ($p=0.018$).

On extinction 2, AM-1.6 and AM-3.2 were significantly different from the control group ($p<0.001$ in both cases). AM-3.2 was also significantly different from AM-0.4 ($p=0.002$). On extinction 3, only AM-3.2 remained significantly different ($p=0.002$) from the control group. These data demonstrate a clear dose-response curve for AM251, since the 3.2- μg dose showed effects in three of the four sessions of extinction, whereas the 1.4- μg dose exerted effects only on two sessions, and the 0.4- μg dose had no effects.

c-Fos and striatal administration of AM251

Intrastratial administration of AM251 produced a clear increase in the number of c-Fos immunoreactive cells in the dorsolateral striatum as compared with the control group and day-5 of training ($P<0.001$ in both cases; Fig. 3c). In contrast, a

significant decrease was observed in the hippocampus ($P < 0.001$; Fig. 3d). Further analysis of the hippocampus revealed a significant decrease in the number of c-Fos-immunoreactive cells in the CA1 region ($P < 0.001$; Fig. 3g) whereas CA3 (fig. 3e) and DG (fig. 3f) remained unchanged. The correlation between CA and CA3 observed during extinction was lost under AM251 (Table 1).

Insert figure 3 about here

Hippocampal administration of AM251

Hippocampal administration of AM251 during extinction was performed to assess the specificity of the striatum on this kind of extinction. As depicted in figure 4 a, hippocampal administration of the most effective dose of AM251 in the striatum (3.2 μg) did not block extinction rather facilitated it significantly in the first session ($p = 0.014$). No differences as compared to the control group were observed in extinction sessions 2, 3, and 4. When compared against AM251-3.2 μg in the striatum, the effect was significantly different in extinction session 1 ($p < 0.001$), session 2 ($p < 0.001$), and session 3 ($p = 0.006$). Similarly to the striatum groups, hippocampal group did not show differences with regard to the control group during the training sessions.

Insert figure 4 about here

Striatal administration of Anadamide

The administration of ANA, a natural agonist of the CB1, into the striatum during extinction was performed to assess the specificity of the CB1 blockade in the striatum on this kind of extinction. As depicted in figure 4 a, 1 μg of ANA in the striatum did not block or facilitates extinction. No differences as compared to the control group were observed in extinction sessions 1, 2, 3, and 4. Similarly to the rest of the groups in the striatum and hippocampus, ANA group did not show differences with regard to the control group during the training sessions.

Finally, rats under the highest dose of AM251 or ANA showed a running speed similar to control groups. Additionally, all rats in all training, extinction and motor control sessions consumed the totality of the rewards indicating that the results on extinction are not related to motor or motivational alterations (Fig. 4 b).

Discussion

Our data indicate that rats learn this task relatively fast, reaching a stable performance in session 3 and maintaining their proficiency through session 5. The c-Fos activity during these stages indicates that the striatum increases its activity on day-1 but not on day 5 when compared with the activity observed in non-trained and food-deprived groups. We discard that the increase in the activity during the first day was caused by the motor activity performed by the rat, since during the 5th day of training, motor activity is also performed and c-Fos immunoreactivity decreases to non significant levels. This fact suggests that the increase during the first day is related with something more than motor activity. After the 5th day of training, during the extinction session, rats show a fast rate of extinction; only five trials are required to learn the new location of the reinforcer, regaining proficiency to a similar level to that exhibited on the 5th day of training. Interestingly, c-Fos activity increases to levels similar to those of day 1 of training, suggesting that the

increase during day 1 is also related with something relevant to the task and the new location of the reinforcer.

Analysis of the general hippocampal activity (not divided by regions) reveals a significant increase in the number of c-Fos positive cells during days 1, 5, and during the extinction session, when compared with day-0. The correlation analysis revealed that CA1 and CA3 are correlated on day-1. On the other hand, and besides the significant increase in general hippocampal activity on day five, no correlation was observed between CA1 and CA3, finally during the extinction session the correlation between CA1 and CA3 is recovered.

These data indicate that day-1 and day-5 are functionally different, in the sense that when rats are exposed for the first time to the task and the learning process is starting (day 1), a correlation between hippocampal regions is required; whereas during day-5 when the task is well learned and proficiency is high this correlation does not seem to be required anymore. Concurrently, striatal activity is reduced on the 5th day as compared with the first day of training. This is consistent with the literature to certain extent. For example, in different studies, the higher activity of the hippocampus has been related with early stages of learning (McIntyre et al. 2003). Here we show an increase in hippocampal activity during the first and last day of training but the correlation of hippocampal sub-regions changed, suggesting that during the last day of training no hippocampal correlation is necessary for solving the task. On the other hand, an increase in striatal activity seems to be necessary on the first day but not on the fifth day.

Based on c-Fos expression, a clear difference in activity of these brain structures is observed depending on the stages of training. Interestingly, during the extinction session when experimental conditions have changed, striatal activity increases anew exhibiting the significant increase lost on the 5th day of training. In addition, the hippocampal activity reaches its highest number of c-Fos reactive cells and, more importantly, the correlation between CA1 and CA3 activity is observed again. The activity during extinction in the hippocampus and striatum is similar to the activity observed during the first day of training when learning is at its beginning. Hence, we believe this kind of activity reflects the hippocampal and striatal encoding of the conditions to be learned in the task, either on the first day of training, when a specific location of the reinforcer must be learned or during the extinction session, when a relocation of the reinforcer must be learned.

The main finding of our experiments is that CB1 receptor activation in the dorsolateral striatum seems to be necessary for the extinction of this particular kind of memory, since its acute blockade prevents extinction (see Fig. 3 a, b). For rats under AM251-3.2 μ g at least 15 trials were required to recover the high level of proficiency; whereas the control (vehicle) group required only 5 trials. According to our data, pharmacological activation of the CB1 in the dorsolateral striatum does not induce any effect on extinction rates (Fig. 4 a), indicating that the effects induced by AM251 are indeed related to the blocked of CB1. Also, the running speed of the animals under the different treatments into the striatum does not change with respect to control groups, discarding any effect on motor activity (Fig. 4b). The blockade of extinction caused by AM251 was accompanied by a significant increase in c-Fos activity in the dorsolateral striatum as compared with the control group in the same condition. This activity was the highest activity

observed in all conditions, suggesting an over-activation of the striatum. On the other hand, the hippocampal activity was reduced as compared with the control group in the same condition. The sub-region analysis of the hippocampus reveals that CA1 activity was significantly decreased and the correlation between CA1 and CA3 was lost. This kind of hippocampal activity is very similar to that observed during the fifth day of training and is consistent with the rat going to the T-maze arm where the reinforcer was originally located. Summarizing, the delay of extinction caused by intrastriatal blockade of CB1 was accompanied by an over-activation of the dorsolateral striatum and similar hippocampal activity to that observed on the 5th day of training.

The specificity of the relevance of the striatal CB1 activation was proven by using the most effective dose of AM251 in the hippocampus. This manipulation resulted in no blockade but rather a facilitation of extinction as observed in the first block of extinction trials. These results are consistent with the proposal that, at the beginning of the training, hippocampal activity is more important for solving the task. At the end of the training, when the task has become a habit, the striatum is more important. However, when conditions change during extinction, the hippocampus is reactivated, presumably to re-evaluate the task conditions as at the beginning of the training (Packard et al. 1989; Pakard and McGaugh 1996; Chang and Gold 2003; McIntyre et al. 2003). It is feasible that the blockade of CB1 in the hippocampus in this phase may facilitate hippocampal participation and hence extinction. This is also consistent with previous reports showing that CB1 blockade in the hippocampus facilitates learning in hippocampal related tasks (Rueda-Orozco et al. 2007; Pamplona et al. 2006; Varvel et al. 2007). Nevertheless, the relationship between hippocampus and striatum and how it is modified by extinction has not been studied. However, our data suggest that, during extinction, the activity of the brain may be similar to the first stages of learning. This is only natural, since the rat is substituting a strategy previously learned but no longer effective with a new more efficient one. Along these lines, previous reports have shown that in different paradigms studied, the extinction process is dependent on protein synthesis, following the same time course as the one occurring in the first acquisition (Inda et al. 2005; Santini et al. 2004). It is noteworthy to mention, that the behavior of the rats, perseverating on the previous location of the reinforcer, indicates that CB1 blockade in the striatum does not affect the ability to recall, since our rats were recalling the previous position very effectively, but prevents the repression of this kind of memory. The exhibition of this behavior also discards possible effects on motor activity.

The blockade of extinction by AM251 in the striatum results in a delayed ability to re-learn the new location of the reward; hence, leading to perseveration on the old position. These results suggest that the cannabinergic modulation of glutamatergic terminals is prevented by AM251, as has been suggested by Köfalvi et al. (2005). Thus, the lack of cannabinergic modulation on glutamatergic terminals may result in hyperactivity of the striatum, as can be seen in the immunohistochemical assays. This hyperactivity may cause the impossibility of extinguishing memories regulated by the striatum. Our data are consistent with previous reports showing that the cannabinergic system is necessary for the extinction of memories (Marcicano et al. 2002; Pamplona et al. 2006; Varvel et al.

2007). Further experiments should be performed to establish the exact role of the CB1 on striatal glutamatergic and GABAergic terminals in the extinction of memories and to determine what kind of cells have been activated.

On the other hand, our data might shed some light on psychiatric conditions, such as obsessive compulsive disorder, in which abnormal activity of the basal ganglia has been suggested as a contributing factor in humans. This condition is characterized by the incapability of extinguishing certain thoughts or actions with the undesirable result of perseverating on a specific action or thought (for a review, see Teking and Cummings 2002; Friedlander and Deschoer 2006). This is similar to the behavior exhibited by our rats under AM251, where perseveration on the previous reinforcer position was observed. Nevertheless, more experiments must be performed to be able to establish an obsessive compulsive disorder model.

Acknowledgements:

We thank Marina Cisneros for her help in the histology procedures and logistics. Research supported by Grant 49797 from CONACYT to OPG. PER was supported by a fellowship from CONACYT and DGAPA-UNAM

References

1. Azad, S.C., Monory, K., Marsicano, G., Cravatt, B.F., Lutz, B., Zieglgänsberger, W., Rammes, G. 2005. Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J. Neurosci.* **24**:9953-61.
2. Barad, M., Jean, P.W., Lutz, B. 2006. The role of the amygdala in extinction of conditioned fear. *Biol. Psychiatry.* **60**:322-328.
3. Castellano, C., Rossi-Arnaud, C., Cestari, V., Costanzi, M. 2003. Cannabinoids and Memory: Animal Studies. *Curr. Drug. Targets CNS Neurol. Disord.* **2**: 389-402.
4. Chang, Q., Gold, P.E. 2003. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J. Neurosci.* **23**: 3001-5.
5. Colombo, P.J., Brightwell, J.J., Countryman, R.A. 2003. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J. Neurosci.* **23**: 3547-54.
6. Deadwyler, S.A., Bunn, T., Hampson, R.E. 1996. Hippocampal ensemble activity during spatial delayed-nonmatch-to-sample performance in rats. *J. Neurosci.* **16**: 354-372
7. Egertova, M., Elphik, M.R. 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J. Comp. Neurol.* **422**: 159-171
8. Eisenhardt, D., Menzel, R. 2007. Extinction learning, reconsolidation and the internal reinforcement hypothesis. *Neurobiol. Learn. and Mem.* **87**: 167-173.
9. Friedlander, L., Desrocher, M. 2006. Neuroimaging studies of obsessive-compulsive disorder in adults and children. *Clin. Psychol.* **26**: 32-49.
10. Gerdeman, G.L., Ronesi, J., Lovinger, D.M. 2002. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.* **5**: 446-451
11. Hampson, R.E., Deadwyler, S.A. 1998. Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol. Dis.* **5**: 474-482
12. Inda, M.C., Delgado-Garcia, J.M., Carrion, A.M. 2005. Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *J. Neurosci.* **25**: 2070-2080
13. Katona, I., Rancz, E.A., Acsády, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., Freund, T.F. 2001. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the GABAergic transmission. *J. Neurosci.* **21**: 9506-9518
14. Köfalvi, A., Rodrigues, T.J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E.S., Cunha, R.A., Sperlágh, B. 2005. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J. Neurosci.* **25**: 2874-2884.
15. Kreitzer, A.C., Malenka, R.C. 2007. Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* **445**: 643-7.
16. Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio,

- M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., Lutz, B. 2002. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**: 530-4.
17. McDonald, R.J., White, N.M. 1993. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdale and dorsal striatum. *Behav. Neurosci.* **107**: 3-22
 18. McIntyre, C.K., Marriot, L.K., Gold, P.E. 2003. Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **79**: 177-83
 19. Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* **20**: 445-468
 20. Morgan, J.I., Curran, T. 1989. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.* **12**: 459-62
 20. Murillo-Rodriguez, E., Desarnaud, F., Prospero-Garcia, O. 2006. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life. Sci.* **79**: 30-37
 21. Murillo-Rodriguez, E., Giordano, M., Cabeza, R., Henriksen, S.J., Mendez-Diaz, M., Navarro, L., Prospero-Garcia, O. 2001. Oleamide modulates memory in rats. *Neurosci. Lett.* **313**: 61-6
 22. Myers, K.M., Davis, M. 2006. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry*, **12**: 120-50.
 23. Packard, M.G., Cahill, L. 2001. Affective modulation of multiple memory systems. *Current opinion in neurobiology* **11**: 752-756
 24. Packard, M.G., Hirish, R., White, N.M. 1989. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J. Neurosci.* **9**: 1465-1472
 25. Pamplona, F.A., Prediger, R.D., Pandolfo, P., Takahashi, R.N. 2006. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology* **188**: 641-9.
 26. Pettit, D.A.D., Harrison, H.P., Olson, J.M., Spencer, R.F., Cabral, G.A. 1998. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J. Neurosci. Res.* **51**: 391-402
 27. Rescorla, R.A. 2001. Experimental extinction. In: Mowrer RR, Klein SB (eds). *Handbook of Contemporary Learning Theories*. Erlbaum: Mahawah, NJ. pp **119**–155.
 28. Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., Manzoni, O.J. 2002. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus acumbens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**: 8384-8388.
 29. Robbe, D., Montgomery, S.M., Thome, A., Rueda-Orozco, P.E., McNaughton, B.L., Buzsaki, G. 2006. Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat. Neurosci.* **12**: 1526-33.
 30. Rueda-Orozco, P.E., Soria-Gomez, E., Montes-Rodriguez, C.J., Martínez-Vargas, M., Galicia, O., Navarro, L., Prospero-García, O. 2007. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*. Sep 6; Epub. ahead of print
 31. Santini, E., Ge, H., Ren, K., Peña de Ortiz, S., Quirk, G.J. Consolidation of

- fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. 2004. *J. Neurosci.* **24**: 5704-5710
32. Singla, S., Kreitzer, A.C., Malenka, R.C. 2007. Mechanisms for synaptic specificity during striatal long-term depression. *J. Neurosci.* **27**: 5260-5264
 33. Squire, L.R. 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* **82**: 171-177
 34. Sullivan, J.M. 1999. Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* **82**: 1286-94.
 35. Tekin, S., Cummings, J.L. 2002. Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry, An update. *J. Psychosom. Res.* **53**: 647-654
 36. Tsuo, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., Walker, J.M. 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1R receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* **83**: 393-411
 37. Varvel, S.A., Laura, E.W., Niyuhire, F., Cravvatt, B.F., Lichtman, A.H. 2007. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology* **32**: 1032-1041
 38. White, N.M., McDonald, R.J. 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **77**: 125-184
 39. Wilson, R.I., Nicoll, R.A. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature* **410**: 588- 592
 40. Zhu, P.J., Lovinger, D.M. 2005. Retrograde endocannabinoid signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala. *J. Neurosci.* **25**: 6199-207.

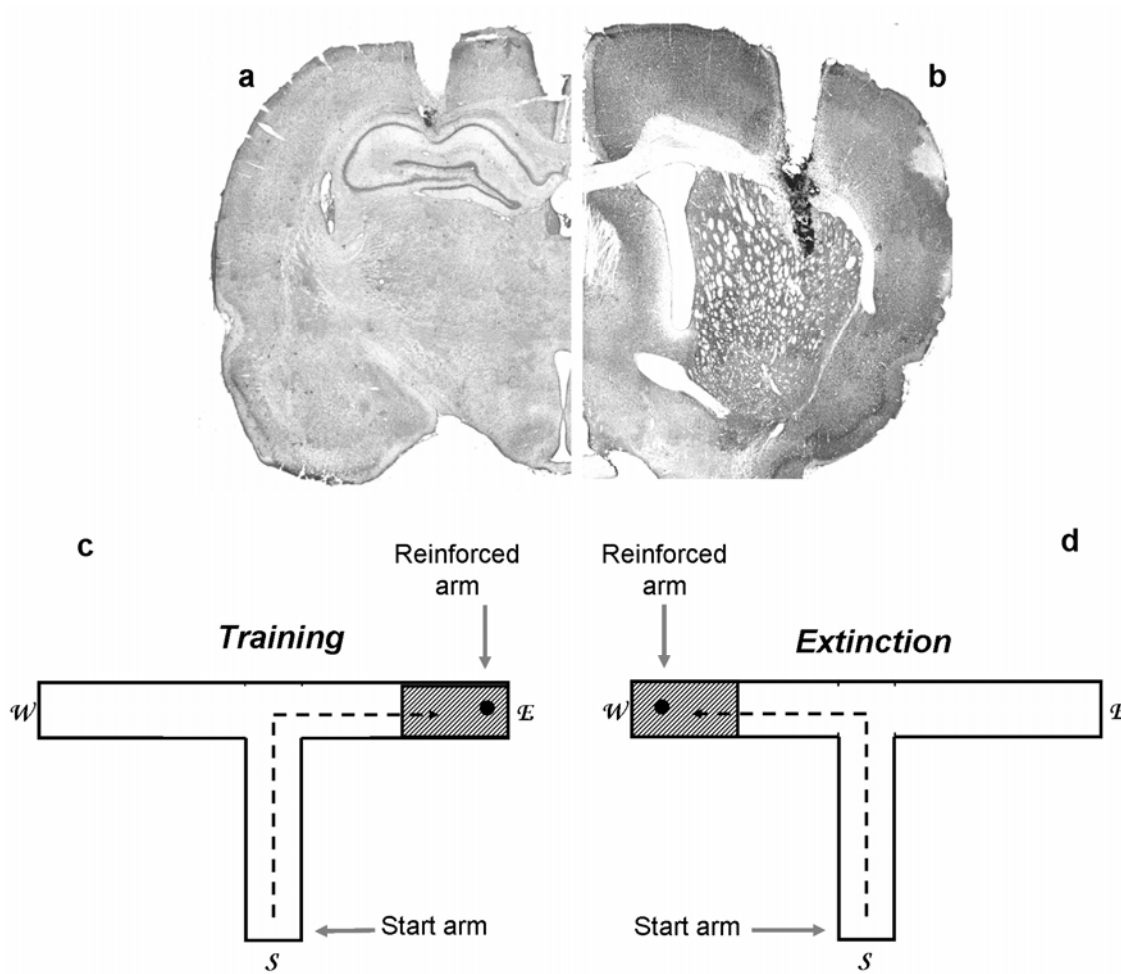


Figure 1. Photomicrographic representation of the injection sites in the hippocampus (a) and striatum (b). Schematic representation of training (c) and extinction (d). During training, rats are released from “S” and reinforced in “E”, during extinction rats are released again from “S” but are reinforced in “W”.

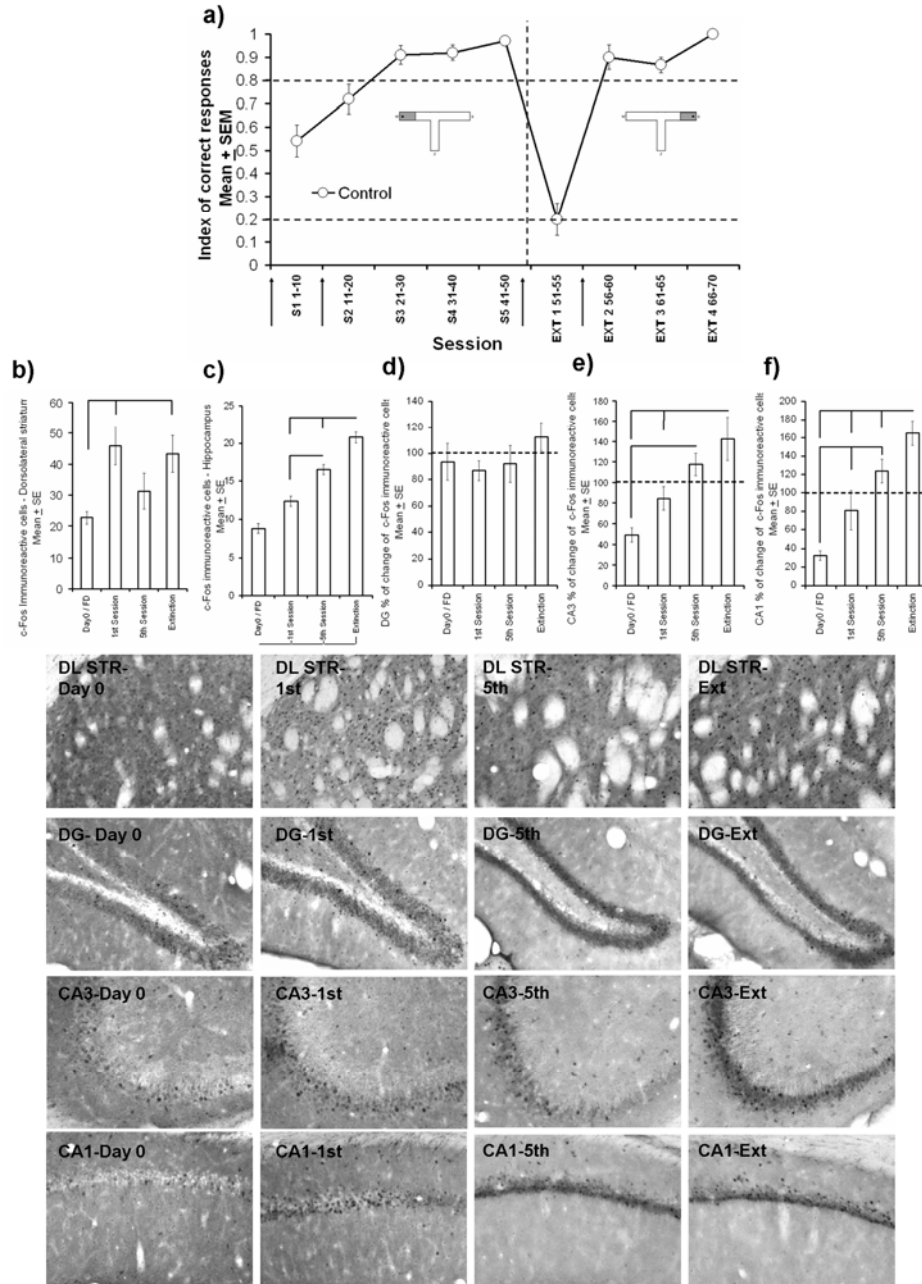


Figure 2. Control group. (a) Performance of rats with no implants during training and extinction sessions. Data are presented as the mean \pm SEM of the index of correct responses (correct trials/total trials). The extinction sessions are presented after vertical dotted line (dashed area on inset maze represents the place where the reinforcer was given during training and extinction sessions), arrows on the x axis indicates the moments at which samples for c-Fos were collected. Horizontal dotted line in 0.8 indicates high preference for the reinforced arm, while dotted line in 0.2 indicates preference for the unreinforced arm. Histograms for c-Fos immunoreactive cells during day-0/FD, 1st and 5th training session and extinction session on the dorsolateral striatum (b), hippocampal formation (c) and DG (d), CA3 (e) and CA1 (f) hippocampal sub-regions, significant differences are represented by lines between corresponding conditions. Bottom panels show representative micrographs of the dorsolateral striatum (DL STR), dentate gyrus (DG), CA3 (CA3) and CA1 (CA1) on day zero (Day-0), training session one (1st) and five (5th), and extinction session (Ext).

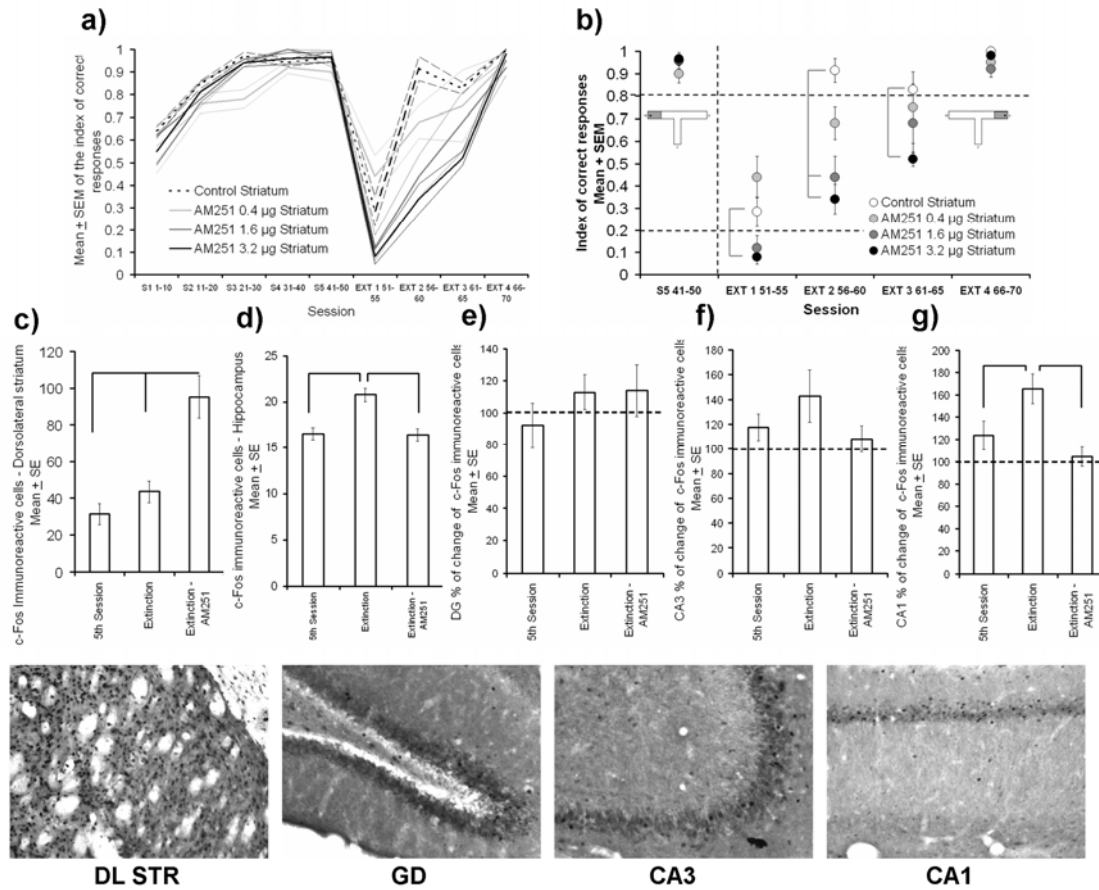


Figure 3. Dose response curve of AM251 in the dorsolateral striatum. (a) Performance of control and experimental groups during training and extinction. Note that no significant differences were obtained among groups during training sessions when no treatment was given; differences emerged during extinction sessions when treatments were given. (b) A closer view of the last day of training (data before vertical dotted line; no differences among groups) and extinction sessions. Note the clear dose-response effect on extinction, with the highest dose been the most effective for delaying extinction; significant differences are marked with lines between specific treatments. Horizontal dotted line in 0.8 indicates high preference for the reinforced arm, while dotted line in 0.2 indicates preference for the unreinforced arm. Histograms for c-Fos immunoreactive cells during the 5th control session and extinction sessions under 3.2 μ g of AM251 (most effective dose on behavior) applied to the dorsolateral striatum (c), hippocampal formation (d), and DG (e), CA3 (f) and CA1 (g) hippocampal sub-regions; significant differences are represented by lines between the corresponding conditions. Bottom panels show representative micrographs of dorsolateral striatum (DL STR), dentate gyrus (DG), and CA3 (CA3) and CA1 (CA1) extinction session under 3.2 μ g AM251. Data from day 0/FD and day 1 of training is presented in figure 2. Data from the 5th and control extinction sessions are presented again for comparison against AM251 treatments.

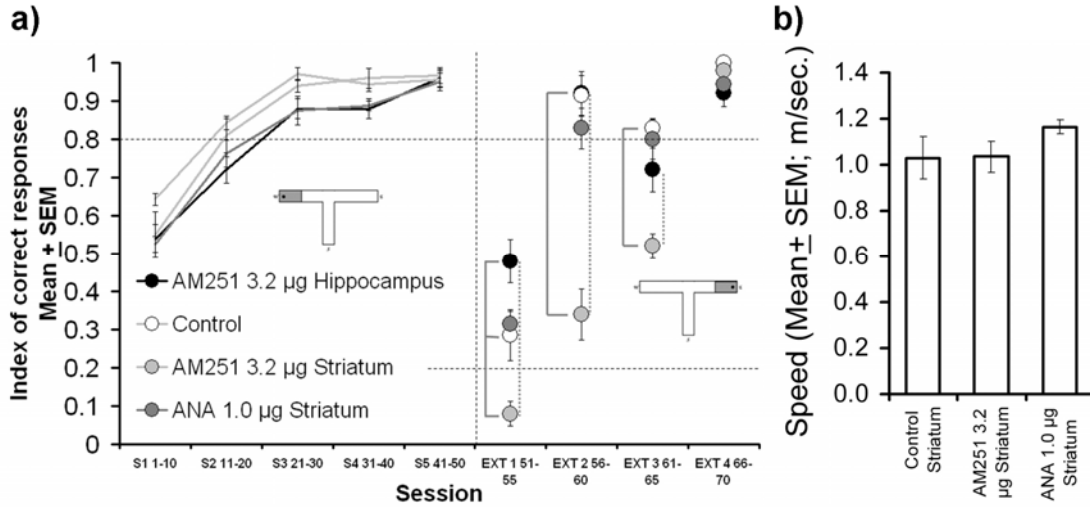


Figure 4. Intrahippocampal administration of AM251 and intrastriatal administration of anandamide. (a) Performance of rats during training (before vertical dotted line) and during extinction sessions under control treatment (open circles), and with 3.2µg of AM251 into the hippocampus (black circles) and into the striatum (clear gray circles) and 1.0µg of anandamide into the striatum (dark gray circles). Note that hippocampal administration does not induce blockade of extinction, it rather facilitates it during the first block of extinction. Also, intrastriatal administration of ANA does not induce any change in extinction rates. Significant differences against control group are indicated by solid lines whereas significant differences between hippocampal and striatal administration of AM251 are indicated by dotted lines. Horizontal dotted line in 0.8 indicates high preference for the reinforced arm, while dotted line in 0.2 indicates preference for the unreinforced arm. (b) Running speed (meters/second) of groups under treatments into the striatum, note that the most effective dose of AM251 and the dose of ANA does not affect running speed indicating no effect on motor activity.

Table 1. Correlations between dorsolateral striatum, hippocampus and the different regions of hippocampus.

DAY 0 / FD				
	CA1	GD	CA3	Hippocampus
DL Striatum	0.655; P=0.230	0.878; P=0.0501	0.881; P=0.0486	0.755; P=0.140
CA1		0.900; P=0.0372	0.882; P=0.0477	0.968; P=0.0068
GD			0.961; P=0.0091	0.965; P=0.0076
CA3				0.955; P=0.0112
DAY 1				
	CA1	GD	CA3	Hippocampus
DL Striatum	0.0461; P=0.941	-0.448; P=0.450	-0.124; P=0.843	0.200; P=0.747
CA1		0.626; P=0.259	0.878; P=0.0499	0.966; P=0.00740
GD			0.373; P=0.537	0.488; P=0.405
CA3				0.886; 0.0457
DAY 5				
	CA1	GD	CA3	Hippocampus
DL Striatum	0.727; P=0.164	-0.309; P=0.613	0.847; P=0.702	0.729; P=0.162
CA1		-0.695; P=0.192	0.385; P=0.523	0.282; P=0.646
GD			-0.0521; P=0.934	0.364; P=0.547
CA3				0.831; P=0.815
Extinction				
	CA1	GD	CA3	Hippocampus
DL Striatum	0.148; P=0.812	0.492; P=0.400	0.191; P=0.758	0.215; P=0.728
CA1		0.334; P=0.583	0.877; P=0.0479	0.984; P=0.0024
GD			-0.109; P=0.861	0.320; P=0.600
CA3				0.885; P=0.0463
Extinction -AM				
	CA1	GD	CA3	Hippocampus
DL Striatum	-0.102; P=0.870	0.048; P=0.938	0.139; P=0.823	0.0280; P=0.964
CA1		0.799; P=0.105	0.556; P=0.330	0.947; P=0.0144
GD			0.252; P=0.682	0.876; P=0.0512
CA3				0.656; P=0.229

10.3 Anexo 3

El anexo 3 es el artículo de revisión realizado durante el 6° y 7° semestre de doctorado y que fue sometido y aceptado para su publicación en la revista “Salud Mental”. Este artículo fue dividido en dos partes y se encuentra incluido en esta tesis por representar una herramienta en la comprensión de los sistemas de memoria.

Referencia:

Rueda-Orozco PE, Montes-Rodriguez CJ, Soria-Gomez E, Herrera-Solis AH, Guzman K, Prospero-Garcia A, Ruiz-Contreras A, Prospero-García O (2006) Dependencia de los sistemas de memoria al ciclo luz-oscuridad en la expresión de estrategias adaptativas. Primera parte. *Salud Mental*, 29: 18-24.

Rueda-Orozco PE, Montes-Rodriguez CJ, Soria-Gomez E, Herrera-Solis AH, Guzman K, Prospero-Garcia A, Ruiz-Contreras A, Prospero-García O (2006) Dependencia de los sistemas de memoria al ciclo luz-oscuridad en la expresión de estrategias adaptativas. Segunda parte. *Salud Mental*, 29: 49-58.

DEPENDENCIA DE LOS SISTEMAS DE MEMORIA AL CICLO LUZ-OSCURIDAD EN LA EXPRESIÓN DE ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS.

PRIMERA PARTE

Pavel E. Rueda-Orozco*, Corinne J. Montes-Rodríguez*, Edgar Soria-Gómez*, Andrea Herrera-Solís*, Khalil Guzmán*, Aldebarán Prospéro-García*, Alejandra E. Ruiz-Contreras*, Oscar Prospéro-García*

SUMMARY

The ability to abstract, store and recover information from the environment in order to generate new strategies to solve problems is one of the most important qualities of the human brain. We mean by strategy, the sophisticated way to solve a problem. A strategy represents in essence the refinement of a given behavior to solve a problem. A strategy could be generalized to solve different problems. The generation of strategies is subjected to the correct functioning of the brain, meaning, alertness, attention, memory among others brain processes in good stand. In this work we focus on the role of memory in the generation of strategies.

In this context, we focus on the literature concerning to memory systems, to show that different memory systems process and store different kinds of information. Therefore, the generation of a given strategy would require the participation of one system instead of other, or at least, one system would be commanding over the others. A memory system is defined as neural network consisting on a central structure communicated through afferences and efferences with others. The ones conveying information to this central structure would provide information from the internal or external environment to be interpreted and stored; while the ones that receive information from the central structure would execute its commands. Curiously, the role of central structure can be played by one structure "A" that in other conditions was under the control of a structure "B". In this condition, "B" is under the control of "A".

In this review we sought to describe the anatomic and physiologic basis of the memory systems and their participation in the expression of strategies for the solution of specific problems. In this first part, we review the literature concerning to the hippocampus and striatum. Our endeavor was to make a synthesis of the main components of the functional neuroanatomy of memory and of its specific participation in the generation and expression of strategies, and also of the influence of the light-dark cycle on the strategies resulting from the interaction of these structures. In this review we focus mainly on the basic description of memory systems and on the data obtained from intact rats and of others with lesions and subject to electrophysiological experiments.

Many studies reviewed on this first part confront subjects to situations where different solutions can be performed; basically this studies are conducted on mazes where the subject can use different kinds of information for spatial orientation. Depending on the nature of the information available or selected by the subject, investigators may infer the kind of strategy the subject is using to solve the problem. From this background, concepts such as stimulus-stimulus strategy and stimulus-response strategy have been generated. The first one consists of making associations between neutral stimuli, to make a conceptual map that guides the subject toward his/her objective. It has been related with the hippocampus function and it has been classically related to the processing, interpretation, and storage of contexts and events as well as to spatial navigation. We center our attention on studies carried out in mazes, showing that lesions or temporal inactivation of the hippocampus disturb the capacity of orientation by using spatial cues. We also review studies where the expression of spatial strategies is correlated with preferential activation of hippocampus detected with different techniques such as immunohistochemistry and microdialysis in vivo.

The stimulus-response strategy, on the other hand, consists on making associations between a particular stimulus and the immediate consequence of its presence. This kind of strategy has been related with the striatum, particularly with its dorsolateral region. For this section we discuss studies where lesions or inactivation of the dorsolateral striatum were performed, on rats submitted to tasks where the solution could be achieved by using stimulus-stimulus or stimulus-response strategy. In subjects with striatal dysfunction the ability to perform using a stimulus-response strategy was disrupted but not the ability to use a stimulus-stimulus strategy. In addition, we revise studies where the expression of the stimulus-response strategy is correlated with a preferential activation of the striatum over hippocampus.

We additionally discuss the interaction hippocampus-striatum to solve a spatial task. We make special emphasis in describing the hippocampal and the striatal systems as independent systems that process and store different kinds of information; therefore, they seem to alternate their activity depending on the demand of the environment. This means that if a stimulus-stimulus strategy is required, the hippocampus will govern the response of the sub-

*Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM.

Correspondencia: Dr. Oscar Prospéro García. Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-250, 04510, México DF, México. Tel: (55) 56 23 2509, Fax: (55) 56 23 2395, E-mail: opg@servidor.unam.mx

Recibido: 20 de abril de 2006. Aceptado: 28 de junio de 2006.

ject, increasing its activity that will be over the activity of the striatum. The opposite will occur if a stimulus-response strategy is required. Studies in humans and rats have been performed to understand the interaction between hippocampus and striatum with similar results. Apparently hippocampus appears more active during the first stages of learning, leading behavior and being expressed as stimulus-stimulus strategy. Later, in learning, the hippocampus decreases in activity and the striatum increases, thus becoming the leader structure. This later activation of striatum has been related with the phase of learning when the task is mastered and is starting to become a habit.

Finally, we devoted special interest to describe the influence of the light dark cycle over these systems and over the goal-oriented behavior. And as we will see on the second part of this review, the functioning of these structures may be regulated by the light-dark cycle. We will review the influence of the presence or absence of light on neurotransmitters release. We will give evidence indicating that the neurochemical modulation depends greatly on the influence of the light-dark cycle and that it results obviously in a different activity of these structures and hence the behavior.

In conclusion, when a subject is confronted with a specific problem, he/she can find the solution by using different strategies. At present, we can not say which are the mechanisms responsible for the selection of a particular strategy at a given moment, but we can say that the expression of any strategy depends on the activity of structures such as the hippocampus and the striatum. In theory each structure represents a memory system or a fundamental part of a memory system. The interaction of the different memory systems, produce a scenario where each system provides, processes, and stores different information about the environment, and this information is useful to generate and exhibit a given strategy.

On the second part of this review we will focus on the functioning and participation of the amygdala and prefrontal cortex, and the influence of the environment on the memory systems.

Key words: Strategy, hippocampus, striatum, amygdala, prefrontal cortex, light-dark cycle.

RESUMEN

Objetivo. Describir las bases anatómicas y fisiológicas de los sistemas de memoria y su participación en la expresión de estrategias para la solución de problemas específicos (estrategias adaptativas). Además, hacemos especial hincapié en la influencia del ciclo luz-oscuridad sobre los sistemas de memoria y la conducta. *Desarrollo.* En esta primera parte se hace una revisión de la bibliografía con respecto al funcionamiento anatómico-fisiológico del hipocampo, el núcleo estriado y su participación en la expresión de estrategias adaptativas. Después nos enfocamos en las ideas básicas de los sistemas de memoria y en experimentos hechos en ratas intactas y lesionadas, además de estudios electrofisiológicos. En este apartado, tratamos de hacer énfasis en el sistema hipocámpal y estriatal como dos sistemas que almacenan diferentes tipos de información pero que al momento de enfrentarse a una situación determinada, ambos aportan un componente fundamental a la conducta que resolverá el problema. En la segunda parte de esta revisión nos encargaremos de analizar la influencia que ejerce el medio ambiente sobre estas estructuras, y de cómo esta influencia afecta la conducta. *Conclusiones.* Cuando un sujeto es sometido a un problema determinado, éste puede solucionarlo con diferentes

estrategias. La génesis y expresión de las estrategias depende de la interacción de diferentes estructuras cerebrales, entre ellas las estructuras relacionadas con los procesos de memoria. Los diferentes sistemas de memoria procesan y almacenan diferentes tipos de información. Esta información es el sustento que utiliza el cerebro para la generación de las estrategias adaptativas.

Palabras clave: Estrategia, hipocampo, estriado, amígdala, corteza prefrontal, ciclo luz-oscuridad.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de abstraer información del medio ambiente, almacenarla, recuperarla y re-crearla para generar nuevas formas de resolver problemas es una de las cualidades más importantes de nuestro cerebro. Baste decir que somos quienes somos por lo que hacemos y porque recordamos quienes somos. Por que además, hemos aprendido una particular forma de resolver problemas. Nuestra vida se encuentra atada al correcto procesamiento de información, a la comparación de esta información con la almacenada previamente y al almacenamiento de información nueva. Todo esto matiza nuestra cotidianidad, nuestro estado de ánimo, nuestra personalidad y de forma muy importante las estrategias con las que enfrentamos al ambiente.

Para fines prácticos nos referiremos a estrategia como el refinamiento de una conducta con un objetivo específico (conducta-orientada-a-objetivo). La esencia de una estrategia es establecer una serie de reglas que puedan aplicarse para la solución de diferentes problemas. Esto hará que el sujeto reduzca el tiempo requerido para solucionarlo, por lo que será más eficiente. Parte de la función de esta regla, estrategia, es permitir que el sujeto elimine automáticamente las opciones que no se ajusten a ella. El refinamiento de una conducta-orientada-a-objetivo que generará una estrategia se adquiere con la reconsolidación. Es decir, cada vez que exhibimos una conducta-orientada-a-objetivo la podemos modificar hacia su mejoría. Es pertinente definir, antes de continuar, lo que estamos llamando aprendizaje. Se trata del proceso mediante el cual el organismo es capaz de modificar su conducta de forma adaptativa y duradera como consecuencia de una demanda del medio ambiente. La memoria, por otro lado, es el nombre que se le asigna al almacén de los recuerdos.

Para su estudio, la memoria y el aprendizaje han sido abordados desde aproximaciones conductuales hasta moleculares y genéticas. Desde los mecanismos más puntuales, como la potenciación a largo plazo o el estudio de la activación de la señalización intracelular como p-CREB y la activación genética, como c-FOS (4, 12, 13, 33), hasta el estudio de la interacción entre diferentes sistemas de memoria (19, 22, 34). El objeti-

vo de esta revisión es analizar la información disponible con respecto al funcionamiento e interacción de diferentes sistemas de memoria para resolver un problema y el fundamento fisiológico de la expresión de una estrategia y la influencia de las condiciones ambientales y fisiológicas en la expresión de las mismas.

SISTEMAS DE MEMORIA

Whithey y McDonald (34) definen a un sistema de memoria como un sistema neural con una estructura central comunicada a través de sus aferencias y eferencias, que recibe información y la procesa en una forma particular, la almacena en circunstancias determinadas e influencia la conducta. Diversos estudios en humanos, ratas y monos (1, 7, 20, 26, 29), han demostrado la existencia de diferentes sistemas de memoria que funcionan independientemente hasta cierto punto. Cada sistema se encarga de almacenar diferentes tipos de información y cada uno está representado por una estructura cerebral diferente. Además, se ha propuesto que cada una codifica diferentes niveles o características de los estímulos (31, 34).

Hasta el momento los estudios se han enfocado en el hipocampo, el núcleo estriado, la amígdala y la corteza cerebral frontal principalmente. La bibliografía muestra que el hipocampo está involucrado en el procesamiento y almacenamiento de información de tipo declarativa, también llamada explícita (9, 30, 37). Por su parte, el núcleo estriado está importantemente relacionado con el procesamiento y almacenamiento de información del tipo estímulo-respuesta (E-R), secuencias de movimientos, hábitos, habilidades y procedimientos (11, 21, 34). La amígdala ha sido propuesta como un facilitador de la función de la actividad estriada e hipocampal (16, 23, 24). Finalmente, la corteza prefrontal se ha propuesto como el sustrato de la memoria de trabajo, un tipo de memoria que hace una representación temporal o un modelo del problema a resolver, basándose en la información sensorial presente y la información que tenemos almacenada en nuestra memoria. De esta manera se valora la mejor forma o estrategia con la cual aproximarse a la solución del problema mencionado (2).

Los estudios recientes se han enfocando en tareas que permiten observar la participación de varios sistemas de memoria en la solución del problema (3, 15, 18, 21, 22). Estas pruebas permiten que los sujetos resuelvan la tarea impuesta escogiendo una estrategia del repertorio de ellas que puedan tener. El uso de diferentes estrategias para resolver la misma tarea, refleja el uso de diferentes estructuras y consecuentemente, diferentes sistemas de memoria (3, 15, 21, 22).

SISTEMA HIPOCAMPAL

Generalidades

El hipocampo del humano mide aproximadamente 5 cm y se extiende desde el *septum* dorsal hasta la región caudal de la amígdala (28) y en la rata mide aproximadamente 4 mm de longitud (25). El hipocampo se divide para su estudio, en una parte dorsal o septal y una parte ventral o temporal. Además, se divide en los cuernos de Amón o CA, el giro dentado y el *subiculum*. Consta de dos capas de células principales, la capa de células piramidales en la región de CA 1, 2, 3 y 4 y la capa de células granulares en el giro dentado.

El hipocampo está conectado con diversas estructuras, pero la mayor vía de entrada procede de la corteza entorrinal, a través de la vía perforante que proyecta hacia el giro dentado, y hacia las regiones de CA3 y CA1. Otra vía de entrada al hipocampo proviene del *septum* a través de la fimbria fórnix e inerva las regiones CA3 y CA1 principalmente. A su vez, la principal vía de salida hipocampal es a través del *subiculum* hacia áreas corticales en donde se incluyen la corteza entorrinal principalmente, y por la fimbria-fórnix al *septum*, al núcleo acumbens, al complejo amigdalino y al hipotálamo.

Internamente el hipocampo se comunica a través de tres vías principales, la vía perforante, que proyecta desde la corteza entorrinal hasta las células granulares del giro dentado, después siguen las fibras musgosas que van del giro dentado hasta las células piramidales en la región CA3. Ahí se originan las colaterales de Schaffer que representan la tercera vía de comunicación y que llegan hasta las células piramidales de la región CA1. La interacción entre estas tres vías se conoce como circuito trisináptico (fig. 1).

Con respecto a la neurotransmisión hipocampal, está ampliamente documentado que el principal neurotransmisor es el glutamato. Las células piramidales de las regiones CA1, CA2 y CA3 son glutamatérgicas, además de las células granulares del giro dentado. Sin embargo, existen otros neurotransmisores que también ejercen su influencia en el funcionamiento hipocampal, por ejemplo, la acetilcolina (ACh) proveniente del *septum* a través de la fimbria fórnix, el ácido gama amino butírico (GABA) liberado por axones provenientes del *septum* y por las interneuronas gabaérgicas residentes en el hipocampo, la noradrenalina (NA) proveniente del *locus coeruleus* y la serotonina (5HT) desde los núcleos del raphe. También están los neurotransmisores retrógrados, por ejemplo, el óxido nítrico (NO) y los endocannabinoides. El primero facilita la neurotransmisión, mientras que los endocannabinoides la reducen.

Función en la memoria: la estrategia estímulo-estímulo (E-E)

La función del hipocampo en la memoria comenzó a

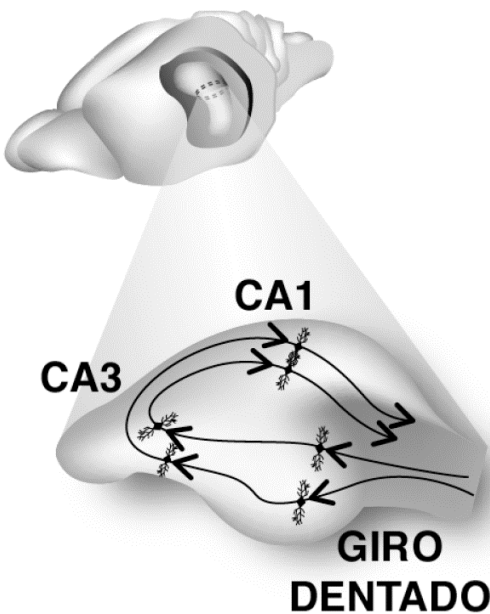


Fig. 1. Hipocampo-Circuito Trisináptico. Muestra de localización del hipocampo en el cerebro de ratona. También se muestran las principales regiones del mismo, (CA1, 2 y 3 y Giro dentado). Se ejemplifican las tres sinapsis del circuito trisináptico.

entenderse gracias a los desafortunados casos de pacientes con lesiones en esta área. El más famoso de estos casos fue el paciente HM quien, por un cuadro epiléptico intratable, fue sometido a una cirugía donde se le extirpó bilateralmente gran parte del lóbulo temporal. Esta lesión incluía el hipocampo y la amígdala. El resultado fue que las crisis epilépticas ya no eran tan severas, sin embargo, tras la cirugía presentaba un problema muy específico con su memoria. El paciente estaba impedido para crear nuevos recuerdos relacionados con eventos, lugares o fechas. Al almacenamiento de este tipo de información se le llamó memoria declarativa o explícita. Sin embargo HM no mostraba problemas en la solución de tareas en donde se requería del aprendizaje de un procedimiento. A este tipo de información se le llamó no declarativa o implícita (29, 30).

Gracias a este hallazgo Larry Squire creó la clasificación que divide a la memoria en declarativa o explícita y no declarativa o implícita y que ha sido un pilar referencial en el estudio de la memoria (para revisión 31). El caso HM representó la primera evidencia de que el cerebro almacena distintos tipos de información y que están relacionados con distintas estructuras, y ésta es la base del estudio de los sistemas de memoria. Estudios posteriores llevaron el caso HM a modelos animales en primates y en roedores (5, 17, 31) y a partir de estos se pudo detectar que el hipocampo era la principal estructura responsable de la memoria declarativa.

Algunos de los trabajos pioneros en este campo utilizaban paradigmas que enfrentaban a los sujetos de

estudio a tareas en las que más de una estrategia podía llevar a la solución de un laberinto (20, 21, 22). De esta forma, utilizando el laberinto radial de ocho brazos en dos modalidades diferentes y lesionando estructuras como el hipocampo, la amígdala y el núcleo estriado, pudo observarse un déficit diferencial en la manera en la que los sujetos resolvían la tarea en forma dependiente de la estructura lesionada (14, 20).

Las lesiones en el hipocampo afectaban principalmente la capacidad de los sujetos para orientarse basándose en las claves espaciales ajenas al laberinto. Estas claves no indicaban con exactitud la posición en la que el punto meta se encontraba, por lo que son consideradas como estímulos neutros. Estas claves, como algunos cuadros o pinturas en las paredes del recinto, fungieron como un contexto general en el que se encontraba el sujeto con respecto a la meta. Al parecer el hipocampo era el responsable de que los sujetos procesaran información de estímulos neutros a partir de los cuales podían orientarse para encontrar la salida del laberinto. Este tipo de orientación se conoce como estímulo-estímulo (E-E). Con este tipo de lesión los sujetos perdían la capacidad de almacenar las relaciones entre estímulos neutros.

Sin embargo, cuando se utilizaba el mismo laberinto pero con la variable de marcar el punto meta con una clave específica hacia donde dirigirse, como la presencia de una luz, los sujetos no mostraban problema alguno para resolverlo. En este caso los sujetos no tenían que memorizar una relación entre varios estímulos neutros para construir un mapa, sino que tenían que memorizar una relación entre un estímulo clave que marcaba puntualmente el lugar al que se debía acudir, una relación entre un estímulo específico y una respuesta específica. Este tipo de orientación se conoce como estímulo-respuesta (E-R). Este hallazgo apoyó aún más la existencia de diferentes sistemas de memoria que procesan y almacenan diferentes tipos de información y además son independientes, o que al menos en circunstancias anormales (lesión) uno puede funcionar sin el otro. Este efecto diferencial en la solución del laberinto radial, fue reproducido más adelante en otros laberintos como el laberinto acuático de Morris o el laberinto en forma de T (21, 22).

Basándonos en los experimentos mencionados, en esta revisión tomaremos al hipocampo como la estructura responsable de procesar y almacenar relaciones entre estímulos neutros y que nos permite exhibir una estrategia de navegación de tipo espacial. El procesamiento de la información del tipo E-E es el responsable de proporcionar el contexto en el que los sujetos se desenvuelven. Dentro de este tipo de información se encuentran las relaciones entre acontecimientos que se suceden en tiempo y espacio. Este tipo de informa-

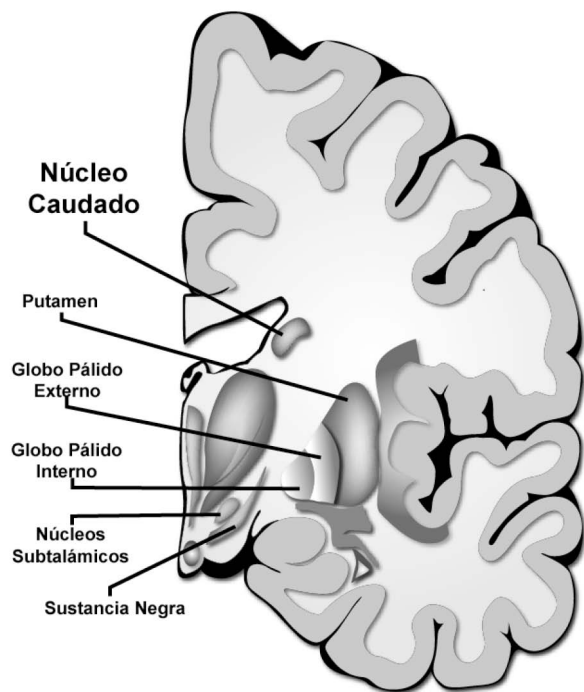


Fig. 2. Estriado. Muestra la localización de los núcleos basales en el cerebro humano. Se señalan los principales núcleos.

ción es aquella que en la clasificación de Larry Squire es conocida como declarativa. La información declarativa o explícita es la que contextualiza a los sujetos en un lugar, en un tiempo y en una situación determinada.

SISTEMA ESTRIATAL

Generalidades

El núcleo estriado es uno de los que componen a los núcleos basales. Estos se componen de varias estructuras subcorticales interconectadas, cuyas principales aferencias van hacia la corteza cerebral, el tálamo y algunas regiones en el tallo cerebral. Recibe información principalmente de la corteza cerebral, los núcleos pedúnculo, pontino, tegmental y del tálamo. Sus cuatro principales núcleos son: el núcleo estriado, el núcleo subtalámico, el globo pálido y la sustancia negra. La principal salida de información de los núcleos basales la representan en conjunto, la sustancia negra y el globo pálido (fig. 2).

En esta revisión nos enfocaremos en el núcleo estriado por su participación en los procesos mnémicos. El estriado se divide en tres importantes regiones, el núcleo caudado, el putamen y el estriado ventral o núcleo *accumbens* (este núcleo no será discutido en esta revisión). El estriado representa la mayor entrada de información a los núcleos basales, las principales estructuras que lo inervan son el tálamo, la corteza, el

puente y la sustancia negra. Sus principales proyecciones van hacia el globo pálido y la sustancia negra (fig. 2).

Aproximadamente 90% de las células estriatales son gabaérgicas. Estas son el principal blanco de las proyecciones que llegan desde la corteza cerebral. También en el estriado se pueden encontrar una serie de interneuronas inhibitorias que son principalmente colinérgicas. Sin embargo, también hay interneuronas que contienen neuropéptido Y, somatostatina y óxido nítrico sintasa, que genera NO.

Función en la memoria: la estrategia estímulo-respuesta (E-R)

Diversos experimentos utilizando el laberinto radial, el laberinto acuático, el laberinto en forma de T y otros, han permitido esclarecer la función del estriado en la memoria. Se ha propuesto que esta estructura es parte fundamental de un sistema de memoria que procesa información diferente a la que procesa el hipocampo, y que su funcionamiento es hasta cierto punto independiente de éste (22).

Los primeros trabajos que mostraron al estriado como un sistema de memoria fueron realizados en la década de 1960 y 1970 (35, 36). Sin embargo fue hasta mediados de los años 80 y principios de los 90, que con los experimentos de disociación de sistemas de memoria, la función del estriado comenzó a esclarecerse (10, 11, 20).

En 1989 Packard y colaboradores con ayuda del laberinto radial de ocho brazos, mostraron que las lesiones del núcleo estriado afectaron sólo una versión de la tarea. El paradigma experimental estaba diseñado con dos protocolos. En el primero las ratas debían encontrar alimento en cada uno de los 8 brazos del laberinto por cada ensayo. En este caso, cada vez que una rata visitaba un brazo que ya había sido visitado en el mismo ensayo, éste era contabilizado como un error. El objetivo en esta versión de la tarea, era que los sujetos recordaran cuáles eran los brazos del laberinto en donde ya habían sido reforzados. El otro protocolo consistía en poner alimento sólo en 4 de los 8 brazos, con la diferencia adicional de que los brazos reforzados con alimento estaban señalados con una luz. Los errores eran contabilizados cada vez que las ratas entraban a un brazo que no estaba marcado con una luz. En teoría los sujetos no tenían que recordar cuáles brazos habían visitado puesto que ahora estaban marcados con una clave específica.

En este experimento se utilizaron ratas con lesiones en el núcleo estriado y ratas con lesiones en el hipocampo. Los resultados mostraron que las ratas lesionadas en el núcleo estriado no tenían problemas para resolver la tarea en la que tenían que recordar los brazos previamente reforzados, mientras que las ratas lesionadas en el hipocampo tenían serios problemas para

resolver esta versión del laberinto. Por el contrario, en la versión donde sólo eran reforzados los brazos iluminados los sujetos con lesiones hipocámpales no mostraron ningún problema, mientras que los sujetos con lesiones estriatales eran incapaces de resolver la tarea de forma eficiente.

En el caso de los sujetos con lesiones estriatales, la capacidad para almacenar las relaciones entre un estímulo (luz) y una respuesta específica (acercamiento) estaba perdida. En este caso la tarea requiere una discriminación entre la presencia y la ausencia de luz relacionada con una respuesta específica. Por ejemplo acercarse al brazo marcado para obtener un reforzador. Este tipo de relaciones entre estímulos y respuestas fue abordado por Hull (8) desde la década de 1940 y ya las había denominado, aprendizaje de tipo E-R.

Después de estos experimentos, otros investigadores reprodujeron estos resultados en diferentes paradigmas (6, 7, 21, 22). Todos estos trabajos han sustentado el hecho de que el núcleo estriado es el responsable de almacenar y procesar información del tipo E-R. Adicionalmente Chang y Gold (3) han podido medir la liberación de acetilcolina en el estriado mientras las ratas están resolviendo el laberinto en T. De esta forma han observado que un aumento en la liberación de ACh en el estriado coincide con el empleo de una estrategia de respuesta (E-R). Incluso se ha podido mostrar que un aumento en la liberación de este neurotransmisor en el estriado predice el empleo de esta estrategia (15).

De esta forma, la evidencia sustenta que el núcleo estriado es un sistema de memoria que puede funcionar independientemente del sistema hipocámpal, y que se encarga del procesamiento y almacenamiento de información del tipo E-R.

La descripción hecha hasta el momento nos ayuda a entender cómo funcionan el hipocampo y el núcleo estriado de forma independiente; sin embargo, en la vida diaria estas estructuras no actúan solas. Al momento de enfrentar a un sujeto de experimentación a una situación determinada, generalmente éste cuenta con la integridad de sus funciones (incluido el hipocampo). ¿Cómo es que éstos interactúan para expresar una conducta determinada?

Estudios en humanos (27) y en ratas (3, 15) se han ocupado de este asunto con resultados similares. En ambos casos se ha presentado una tarea en la que ambas estructuras (hipocampo-estriado) pueden participar en la solución del problema; en ambas tareas se ha probado que la ausencia de una u otra estructura afecta diferencialmente la ejecución de la tarea (11, 21). En este tipo de tareas y midiendo la actividad cerebral mediante resonancia magnética funcional (en el caso de los humanos) y la liberación de acetilcolina en el

estriado e hipocampo (en el caso de las ratas) se ha podido observar que al iniciar la adquisición de la tarea el hipocampo tiene una activación preferencial sobre el estriado. Por el contrario, una vez que la tarea ya esta dominada y se va volviendo mas cotidiana, el estriado presenta una activación preferencial sobre el hipocampo. De esta forma la relación de estas dos estructuras no se limita a adquirir diferentes tipos de información sino a relevarse en diferentes tiempos en el proceso de aprendizaje.

Otro factor que puede influir en la forma en que los sistemas de memoria interactúan es el medio ambiente; más adelante en esta revisión (segunda parte) se revisará la influencia del ciclo luz-oscuridad (parte fundamental del medio ambiente) en la expresión de estrategias.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo del donativo 42060 del CONACYT, otorgado a OPG. Todas las ilustraciones son obra del licenciado Benito Moreno Gómez.

REFERENCIAS

1. ALVAREZ P, ZOLA-MORGAN S, SQUIRE LR: The animal model of human amnesia: Long-term memory impaired and short-term memory intact. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:5637-41, 1994.
2. BADDELEY A: Working memory: Looking back and looking forward. *Nature Reviews*, 4:829-39, 2003.
3. CHANG Q, GOLD PE: Switching memory systems during learning: Changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J Neurosci*, 23:3001-5, 2003.
4. COLOMBO PJ, BRIGHTWELL JJ, COUNTRYMAN RA: Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. *J Neurosci*, 23:3547-54, 2003.
5. EICHENBAUM H: Declarative memory: Insights from cognitive neurobiology. *Annu Rev Psychol*, 48:547-72, 1997.
6. FEATHERSTONE RE, McDONALD RJ: Dorsal Striatum and stimulus-response learning: lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a simple discrimination task. *Behav Brain Res*, 150:15-23, 2004.
7. FERNANDEZ-RUIZ J, WANG J, AIGNER TG, MISHKIN M: Visual habit formation in monkeys with neurotoxic lesions of the ventrocaudal neostriatum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:4196-201, 2001.
8. HULL CL: *The Principles of Behavior*. Appleton-Century, Nueva York, 1943.
9. KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM: *Principles of Neural Science*. McGraw Hill, Nueva York, 2000.
10. KNOWLTON BJ, MANGELS JA, SQUIRE LR: A neostriatal habit learning system in humans. *Science*, 273:1399-1402, 1996.
11. KNOWLTON BJ, SQUIRE LR, GLUCK MA: Probabilistic classification learning in amnesia. *Learn Mem*, 2:106-20, 1994.
12. LYNCH MA: Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 84:87-136, 2004.
13. MALENKA RC: The long-term potentiation of LTP. *Nature Review*, 4:923-6, 2003.

14. McDONALD RJ, WHITE NM: A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci*, 107:3-22, 1993.
15. McINTYRE CK, MARRIOT LK, GOLD PE: Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 79:177-83, 2003.
16. McINTYRE CK, POWER AE, ROOZENDAAL B, McGAUGH JL: Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann N Y Acad Sci*, 985:273-93, 2003.
17. MISHKIN M: Memory in monkeys severely impaired by combined but not separate removal of amygdaloid and hippocampus. *Nature*, 273:297-8, 1978.
18. OLIVEIRA MGM, BUENO OFA, POMARICO AC, GUGLIANO EB: Strategies used by hippocampal- and caudate-putamen-lesioned rats in a learning task. *Neurobiol Learn Mem*, 68:32-41, 1997.
19. PACKARD MG, CAHILL L: Affective modulation of multiple memory systems. *Curr Opin Neurobiol*, 11:752-756, 2001.
20. PACKARD MG, HIRSH R, WHITE NM: Differential effects of fornix and caudate nucleus on two radial maze tasks: Evidence for multiple memory systems. *J Neurosci*, 9:1465-72, 1989.
21. PACKARD MG, McGAUGH JL: Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci*, 106:439-46, 1992.
22. PACKARD MG, McGAUGH JL: Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learning Memory*, 65:65-72, 1996.
23. PACKARD MG, TEATHER LA: Amygdala modulation of multiple memory systems: Hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem*, 69:163-203, 1998.
24. PARE D: Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Progress Neurobiol*, 70:409-20, 2003.
25. PAXINOS G, WATSON C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, INC, San Diego, Nueva York, Boston, Londres, Sydney, Tokio, Toronto, 1986.
26. PENFIELD W, MILNER B: Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 79:475-97, 1958.
27. POLDRACK RA, CLARK J, PARE-BLAGOEV EJ, SHOHAMY D y col.: Interactive memory systems in the human brain. *Nature*, 414:546-550, 2001.
28. PRUESSNER JC, LI LM, SERLES W, PRUESSNER M y cols.: Volumetry of hippocampus and amygdala with high-resolution MRI and three-dimensional analysis software: Minimizing the discrepancies between laboratories. *Cerebral Cortex*, 10:433-442, 2000.
29. SCOVILLE WB, MILNER B: Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20:11-21, 1957.
30. SQUIRE LR, KANDEL ER: *Memory: From Mind to Molecules*. Scientific American Library, Nueva York, 2000.
31. SQUIRE LR: Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev*, 99:195-231, 1992.
32. SQUIRE LR: Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol Learning Memory*, 82:171-177, 2004.
33. TTSCHMEYER W, GRIMM R: Activation of immediate early genes and memory formation CMLS. *Cell Mol Life Sci*, 55:564-574, 1999.
34. WHITE NM, McDONALD RJ: Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learning Memory*, 77:125-84, 2002.
35. WINOCUR G, MILLS JA: Effect of caudate lesions on avoidance behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol*, 68:552-7, 1969.
36. WINOCUR G: Functional dissociation within the caudate nucleus on rats. *J Comp Physiol Psychol*, 86:432-9, 1974.
37. ZIGMOND MJ, BLOOM FE, LANDIS SC, ROBERTS JL, SQUIRE LR: *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, San Diego, 1999.

DEPENDENCIA DE LOS SISTEMAS DE MEMORIA AL CICLO LUZ-OSCURIDAD EN LA EXPRESIÓN DE ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS.

SEGUNDA PARTE

Pavel E. Rueda-Orozco*, Corinne J. Montes-Rodríguez*, Edgar Soria-Gómez*, Andrea Herrera-Solís*, Khalil Guzmán*, Aldebarán Prospéro-García*, Alejandra E. Ruiz-Contreras*, Oscar Prospéro-García*

SUMMARY

In the first part of this work we reviewed the hippocampus and striatum anatomy and function in the context of the memory systems. In this second part we describe the anatomic and physiologic basis of the memory systems represented by the amygdala and prefrontal cortex (PFC) and their participation in the expression of strategies for the solution of specific problems. Amygdaloid formation is divided in three principal regions, the basolateral nucleus, the superficial nucleus, and the centromedial nucleus. Amygdala is highly connected with several regions of the brain including hippocampus, striatum and PFC. Amygdala has been implicated in the processing, storing and retrieval of emotional information.

Another function proposed for the amygdala is to modulate the activity of structures such as the hippocampus, the striatum and the cerebral cortex. The participation of the amygdala has been shown in different tasks such as the Morris water maze, the radial maze, the passive avoidance task, and the freezing behavior among others. In some of these studies it has been shown that the activation of the amygdala enhances the acquisition of the task. When the amygdala is activated pharmacologically it is able to enhance the acquisition of hippocampus or striatum related tasks. In these context, the efficiency of the amygdala activation depends on the synchrony, the precise time, at which it occurs in relation to the event the subject is learning. This is, either immediately before, during or immediately after learning.

In support of this enhancing role of the amygdala, some electrophysiological studies have shown that the activation of the amygdala facilitates the development of LTP in the hippocampus while its lesion decreases it. On the other hand, it has also been shown that the amygdala activation increases c-Fos expression in both, the hippocampus and the striatum.

In summary, the amygdaloid formation has been proposed as an enhancer of learning, representing the emotional component of the response to the environment.

PFC is the other structure involved in the generation of strategies. It has been related with the correct functioning of higher functions such as memory, attention, emotion, anticipation and planning. It has been called the central executor for its fundamental role as a coordinator of past, present information and future

performance. It is been proposed as responsible for the so called working memory, that allows to put together different kinds of information at the same time, giving the chance of comparing, selecting and generating a goal-oriented behavior.

Working memory has been studied with many different techniques, however electrophysiological experiments have shown interesting aspects of its functioning. Recording cells from the PFC of monkeys, Goldman-Rakic showed that these cells remain firing in a short period of time when visual information should be retained to be used in ulterior comparison task. This cell activity suggests that these neurons would be responsible for the maintenance of information in our "mind" a short period of time. These results have been replicated in humans by using real time imaging techniques as fMRI and PET. Again, during the periods of retention of the information, the activity on prefrontal areas increase until such information is used.

Besides working memory, anticipation is another important function regulated by the PFC. Several studies have shown that the activity of prefrontal cortex increases before the performance, it seems like the prefrontal cortex predicts the actions in the environment and readily generates a strategy to efficiently act in response.

PFC is connected reciprocally with the hippocampus, the striatum and the amygdala, the relation between these structures is under heavy investigation. Regarding the hippocampus, some interaction has been observed, and it has been proposed an interaction between these structures for the long term consolidation of memory. As for the striatum, the relationship with PFC has been studied preferentially with the ventral striatum or nucleus accumbens with respect to reinforcement of behavior. We understand poorly the relationship with the dorsal striatum.

The relation between amygdala and PFC, on the other hand, has been studied in relation to the expectancy of the reinforcement. This is defined as the representation in the mind of the reinforcement and the association of that representation with the conditions under which it was delivered. In simple words, this is a way to explain how is that a subject prefers a specific reinforcer over another. It has been shown that lesions of the basolateral amygdala as well as PFC interfere with the expectancy of reinforcement. The function of the amygdala in this case is to provide the emotional component related to the presence of the reinforcement.

*Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, México.

Correspondencia: Dr. Oscar Prospéro-García. Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-250, 04510, México, DF. Tel: (55) 5623 2509, Fax: (55) 5623 2395, E-mail: opg@servidor.unam.mx

An extensive literature has addressed the question of circadian variations in the release of neurotransmitters. For example, the diurnal variations in the release of acetylcholine in the hippocampus and PFC. The binding for acetylcholine, serotonin and norepinephrine to glutamatergic hippocampal cells is different depending on the light-dark cycle, suggesting that the modulation of the hippocampus by these neurotransmitters is different depending on the presence or absence of light.

In this review, we have devoted special interest to the influence of the light dark cycle on these mnemonic systems and on goal-oriented behaviors. We analyze selected papers from the available literature on circadian rhythms and memory, emphasizing the hippocampus role. We believe that the study of this relationship (brain/light-dark cycle) could be a useful tool to understand how the environment influences behavior.

On this topic, there's evidence that the learning of a task may be different depending on the part of the day when it was learned. For example, it has been shown in humans that when subjects are submitted to explicit or implicit task the performance is different depending on the hour of the day, being better during the light for the explicit memory and better during the dark for the implicit memory. Studies in rats trained in fear conditioning tasks, showed that subjects learn the task easily when they are trained during the light phase of the cycle and the learned behavior showed a higher resistance to extinction.

Conclusion. When a subject is confronted with a specific problem, he/she can find the solution by using different strategies. The expression of one of those strategies depends on the interaction of the different memory systems, these systems process and storage different kinds of information, and this information is useful to generate and exhibit a given strategy. The memory systems are constantly under the influence of the environment, one critical component of this environment is the light-dark cycle, which apparently is modulating the activity of these structures. As a result of the influence of the light-dark cycle on these structures, the behavior of the subject would be modulated as well. All these interaction just for the sake of adaptation, survival, and reproduction in this rotating and translating world.

Key words: Strategy, hippocampus, striatum, amygdala, prefrontal cortex, light-dark cycle.

RESUMEN

En la primera parte de esta revisión nos encargamos de revisar al hipocampo y al estriado en el contexto de los sistemas de memoria. En esta parte revisaremos las bases anatómicas y fisiológicas de los sistemas de memoria representados por la amígdala y la corteza prefrontal así como su participación en la expresión de estrategias para la solución de problemas específicos (estrategias adaptativas). En este apartado haremos hincapié en las funciones básicas que se le atribuyen a estas estructuras, su participación en la expresión de estrategias adaptativas y la influencia que ejercen sobre otros sistemas de memoria como el hipocampo y el estriado. Aquí revisamos el papel de la amígdala como modulador del hipocampo y el estriado. También revisamos los conceptos de memoria de trabajo y anticipación como las principales funciones de la corteza prefrontal o neocorteza y su relación con los otros sistemas de memoria. Finalmente revisamos la bibliografía disponible acerca de los ritmos circadianos y su relación con la memoria. Haremos énfasis en la función del hipocampo. Nosotros creemos

que estudiar las relaciones mencionadas puede ser una herramienta útil para comprender cómo es que el medio ambiente influencia la conducta.

Conclusiones. Cuando un sujeto es sometido a un problema determinado, éste puede solucionarlo con diferentes estrategias. La génesis y expresión de las estrategias depende de la interacción de diferentes estructuras cerebrales, entre ellas las estructuras relacionadas con los procesos de memoria. Los diferentes sistemas de memoria procesan y almacenan diferentes tipos de información. Esta información es el sustento que utiliza el cerebro, probablemente la corteza prefrontal, para la generación de las estrategias adaptativas. Por otro lado existe información que sugiere que el ciclo luz-oscuridad modula la actividad de las diferentes estructuras mencionadas. Esto implicaría que la conducta, la forma como un sujeto se adapta a su medio, estaría a su vez matizada por el ciclo luz-oscuridad.

Palabras clave: Estrategia, hipocampo, estriado, amígdala, corteza prefrontal, ciclo luz-oscuridad.

SISTEMA AMIGDALINO

Generalidades

La amígdala es uno de los núcleos pertenecientes al sistema límbico. Es una de las estructuras relacionadas con la modulación de la expresión de las emociones. Su participación en los procesos de aprendizaje y memoria está relacionada al manejo de información emocional. Se ha propuesto como un facilitador de la actividad de otras estructuras relacionadas con la memoria como el hipocampo y el núcleo estriado y que se activa en situaciones de estrés (39, 42, 43, 44).

Anatómicamente, en la rata, la amígdala es una estructura con forma de almendra que se encuentra en la profundidad del lóbulo temporal. Está dividida en tres regiones principales: el grupo baso-lateral o profundo, que incluye el núcleo lateral, el núcleo basal y el núcleo accesorio basal. El grupo superficial o amígdala cercana a la corteza, que incluye los núcleos corticales y el núcleo lateral del tracto olfativo. Y por último el grupo centro-medial compuesto por los núcleos central y medial (fig. 1).

La amígdala está interconectada con diversas estructuras corticales y subcorticales. Recibe proyecciones sensoriales gustativas, táctiles, olfativas, visuales, auditivas y viscerales. Recibe proyecciones de toda la corteza cerebral, del tálamo, del hipotálamo y de la corteza perirrinal. Está importantemente conectada con el puente y la médula espinal. Además recibe proyecciones de estructuras relacionadas con la memoria como el hipocampo y el estriado (55).

La corteza prefrontal representa el principal aporte de información hacia la amígdala por parte de la corteza cerebral. Los núcleos de la base también envían proyecciones hacia la amígdala y éstas llegan principal-

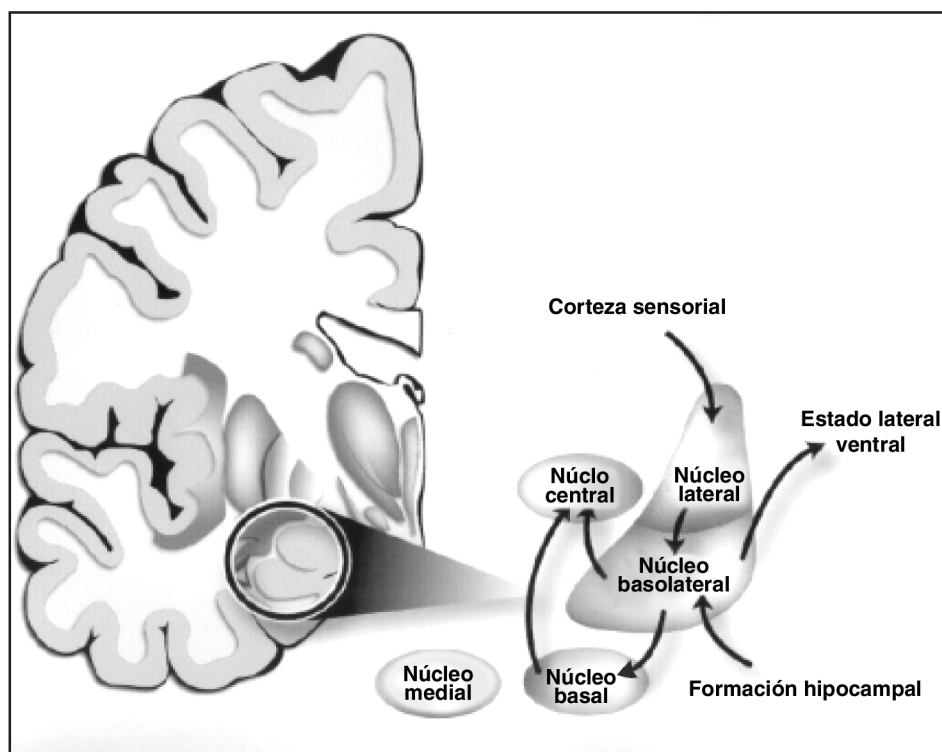


Fig. 1. Amígdala. Muestra la localización de la amígdala en el cerebro humano, sus principales núcleos y la forma en que se encuentran interconectados.

mente a la región baso-lateral amigdalina. Las proyecciones entre la amígdala y el hipocampo son recíprocas y el hipocampo proyecta principalmente hacia la región baso-lateral.

Las vías de salida de la amígdala, al igual que las vías de entrada, son abundantes y proyectan principalmente hacia la corteza cerebral, tálamo, hipotálamo, puente y médula espinal. Además, y de especial interés para esta revisión, desde la región baso-lateral proyecta hacia la corteza cerebral, principalmente al área órbito-frontal, al núcleo *accumbens*, al núcleo estriado y al lóbulo temporal medial donde se incluye el hipocampo.

Función en la memoria: grabación de las estrategias en piedra

La región amigdalina más estudiada en relación a los procesos de memoria es la amígdala baso-lateral. La principal evidencia de que la amígdala interviene en la modulación de la memoria proviene de los estudios de condicionamiento clásico, específicamente el condicionamiento de respuestas de miedo (53). En este tipo de tareas, los sujetos asocian la presencia de un estímulo neutro, por ejemplo un estímulo auditivo o visual con un estímulo aversivo, como un choque eléctrico. La respuesta que se produce en este caso se conoce como conducta de congelamiento y consiste en una ausencia de movimiento excepto por los movi-

mientos de la respiración. Esta respuesta generalmente va acompañada por un aumento en la tasa respiratoria y una aceleración del ritmo cardíaco. Se ha propuesto que la amígdala matiza y fortalece la consolidación de recuerdos con un componente emocional (38).

Una aproximación al estudio de las funciones de la amígdala, es observar su participación en combinación con otros sistemas de memoria, como el sistema hipocámpal o el estriado. Al respecto, existen numerosos trabajos que muestran la interacción entre estos sistemas (36, 43).

Se ha podido mostrar la participación del núcleo baso-lateral de la amígdala en el aprendizaje de diferentes tareas como el laberinto acuático de Morris (53), la prevención pasiva (21, 22), el laberinto radial (1, 34, 35, 48), el condicionamiento del miedo (29, 30, 61) entre otras. En algunos de estos trabajos se ha mostrado que la activación de este núcleo facilita la adquisición permanente del estímulo.

Un aspecto importante del funcionamiento amigdalino es el momento en el que participa dentro del proceso del aprendizaje. Para que la activación de la amígdala tenga un efecto en la conducta es necesario que su activación se presente temporalmente cercana al aprendizaje de una tarea (37, 39, 44). Se ha mostrado que la activación de la amígdala potencia el aprendizaje de una tarea de memoria, sólo cuando esta activación se produce justo antes, durante o inmediatamente des-

pués de la presentación de la prueba. Si la activación de la amígdala se produce mucho tiempo antes o después de la prueba no tendrá efecto alguno sobre ésta (37).

De hecho, desde la década de 1900 Yerkes y Dodson sustentaron un principio al cual se le conoce como ley o principio de Yerkes y Dodson (63), en el cual establecen que la eficiencia de la ejecución depende importantemente del estrés en el que se encuentre el sujeto. Sustentan que tanto un bajo como un alto nivel de estrés inducen una pobre ejecución. Niveles intermedios o moderados de estrés optimizan la ejecución. El estrés, mediado en parte por la amígdala, nos ayuda a grabar nuestras estrategias en piedra.

Se ha observado que la amígdala no es la responsable de almacenar la información que potencia con su activación. En estudios donde la amígdala es inactivada o lesionada posteriormente a los entrenamientos en distintas tareas, no se observa algún efecto sobre la evocación (42, 45). Esto muestra que la amígdala participa únicamente en el establecimiento de los recuerdos, en el momento en que la información es almacenada; sin embargo, no participa en la recuperación de la misma. Una vez que la información ha pasado al almacén de largo plazo, la amígdala ya no es necesaria.

Experimentos electrofisiológicos muestran que la activación de la amígdala facilita el establecimiento de potenciación a largo plazo (PLP) en el hipocampo, mientras que las lesiones la disminuyen (28). La PLP es un paradigma de estimulación eléctrica que se ha estudiado como la base electrofisiológica de la memoria. Por otro lado, también se ha observado que la estimulación amigdalina produce un incremento en la expresión de c-FOS en el hipocampo y en el núcleo estriado (43). La c-FOS es una proteína codificada por un gen de expresión temprana que se ha utilizado como marcador de actividad celular. Es decir, a mayor actividad celular mayor expresión de c-FOS. Estos datos muestran que la activación de la amígdala afecta directamente la activación del hipocampo y del estriado.

El grupo de James McGaugh (42), utilizando el laberinto acuático de Morris, ha mostrado que en una tarea en donde una “solución hipocampal” o una “solución estriatal” pueden presentarse, la activación de la amígdala puede facilitar de manera inespecífica el almacenamiento de una u otra solución, independientemente de que las demandas del medio faciliten la expresión de una u otra estrategia.

En el contexto de los sistemas de memoria, la amígdala es la encargada de sensar la respuesta autonómica ante el estrés. Transforma esta respuesta autonómica en estimulación sobre las estructuras como el hipocampo y el estriado. Esta estimulación se ve reflejada en un aumento en la excitabilidad neuronal y por lo tanto en una facilitación de la actividad de estas estruc-

turas y del almacenamiento de la información que éstas procesan. Esta facilitación es dependiente del tiempo, del momento en el aprendizaje en el que la amígdala se active.

En resumen, la evidencia existente apunta a que la amígdala juega un importante papel como facilitador de los procesos de memoria. Este elemento es, por su interacción con el medio ambiente, una parte importante de la comunicación entre el medio interno con las demandas del medio externo. Si el medio demanda atención porque está retando al sujeto con estresores de gran magnitud, entonces este sistema amigdalino se activa y proporciona una respuesta que permite un nivel de activación mayor en las estructuras que inerva, facilitando el almacenamiento de la información.

Por otro lado, existen numerosos e importantes trabajos que muestran a la amígdala como la estructura indispensable para el almacenamiento de información aversiva como en el caso del condicionamiento del miedo (31, 32).

CORTEZA PREFRONTAL

La corteza frontal se encuentra hacia la parte rostral de la cisura central, y se le responsabiliza de la generación de conductas orientadas a un objetivo, a cuyo refinamiento le estamos llamando estrategias (14). De acuerdo con la bibliografía científica la corteza prefrontal o neocorteza es fundamental para el correcto funcionamiento de procesos cognitivos superiores como la memoria, la atención o las emociones (17, 19, 20). Sin embargo, y como hemos observado a lo largo de esta revisión, estas funciones están altamente relacionadas con otras estructuras como el hipocampo, el núcleo estriado y la amígdala. Se ha propuesto que la corteza frontal funciona como el “ejecutor central”. Esto es, un coordinador de la información, tanto de la nueva, la que está ocurriendo en el preciso instante (la entrada sensorial), como de la ya existente, proporcionada por la memoria almacenada en el hipocampo y el estriado. Como hemos enfatizado al principio de esta revisión, la memoria de trabajo, dependiente de la CPF, genera un modelo temporal dinámico del problema, que permite el acomodo de la información proveniente de la entrada sensorial. Si el modelo creado es eficiente, entonces la entrada sensorial es bien interpretada y la conducta-orientada-a-objetivo es exitosa. Con la repetición del problema, el modelo se recrea, pero ahora con el conocimiento de la solución, por lo que ocurre una re-consolidación que refina la conducta y genera la estrategia.

Se le han atribuido dos funciones fundamentales a la corteza frontal, la memoria de trabajo y la planeación

a futuro. Ambas actividades nos llevan a la toma de decisiones. En esta sección revisaremos los experimentos que fundamentan dichas funciones.

Generalidades

La corteza prefrontal se encuentra dividida en tres grandes partes: la orbital, la medial y la dorsolateral. Se encuentra conectada con el tallo cerebral, el tálamo, los núcleos de la base y el sistema límbico. Sus tres regiones principales se encuentran interconectadas directamente y a través del tálamo. Por su parte, las cortezas orbital y medial se encuentran conectadas con el hipotálamo y otras estructuras límbicas, como la amígdala. La región lateral manda proyecciones hacia los núcleos de la base, la corteza occipital, temporal y parietal (fig. 2).

De acuerdo a los sitios con los que están conectadas estas tres regiones podemos inferir parte de su función. Por ejemplo, la corteza orbital está importante-mente relacionada con el sistema límbico y por lo tanto con el control de las emociones. Por otro lado, las conexiones recíprocas entre la región dorsolateral y el hipocampo son de gran importancia para procesos como el aprendizaje y la memoria. Por su parte, las proyecciones hacia el núcleo estriado y los ganglios de la base son importantes para el control motor y el aprendizaje de hábitos o secuencias de movimientos. Función en la memoria: *¿Quo Vadis, Domine?*

Memoria de trabajo

La memoria de trabajo se refiere al mantenimiento temporal de la información en nuestra “mente”. Se ha propuesto que existe un sistema específico que mantiene y almacena información en el corto plazo (2, 3). Es decir, el mantenimiento de la información en un estado “disponible” para la solución de un problema específico en una circunstancia específica.

Los estudios clásicos al respecto provienen de la década de 1980 cuando el grupo de Patricia Goldman-Rakic mostró que las células de la corteza prefrontal de monos se mantenía disparando en el lapso transcurrido entre la desaparición, por un período breve, de un estímulo visual (una figura geométrica), y su reaparición entre otras figuras, para su reconocimiento (16). Mientras los sujetos realizaban este tipo de tareas, la actividad cerebral estaba siendo monitoreada. De esta forma pudo observarse que durante los periodos en que los sujetos debían mantener la información, las células de la corteza dorsolateral prefrontal aumentaban su tasa de disparo. Estas observaciones han sugerido que el aumento de la frecuencia de disparo de las neuronas es un indicador de que esta región cerebral está “manteniendo” en la memoria información física del estímulo. Es decir, la memoria de la información ofrecida por la entrada sensorial está siendo mantenida dentro de un contexto generado por la memoria del sujeto, para generar una conducta-orientada-a-objetivo.

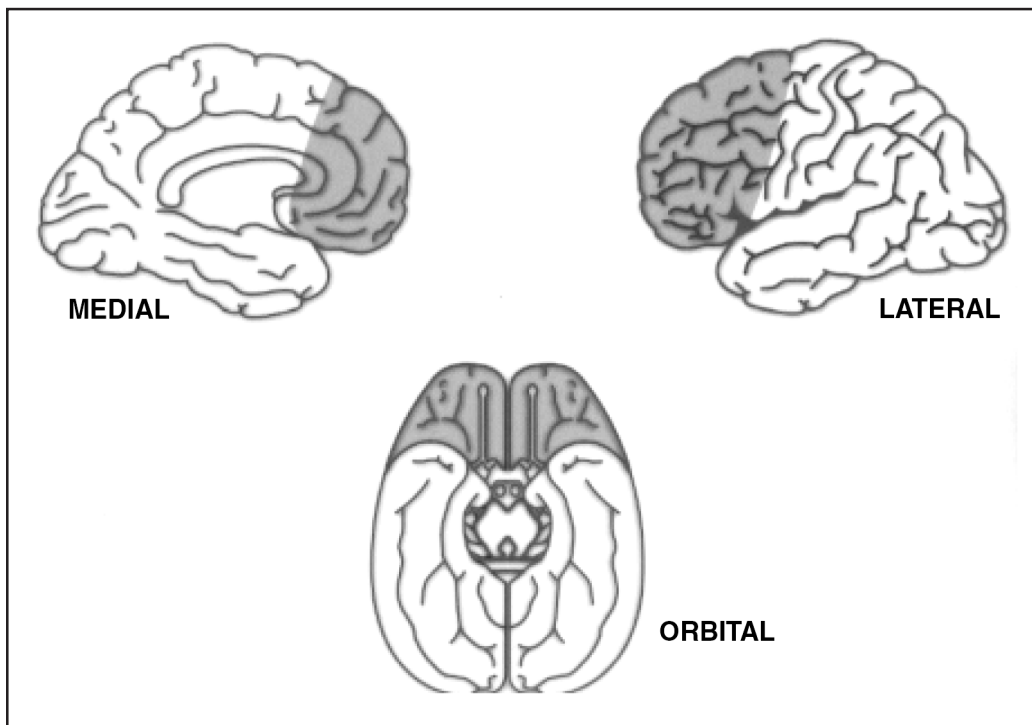


Fig. 2. Corteza prefrontal. En oscuro se muestra la localización de las tres principales regiones de la corteza prefrontal en el cerebro de humano.

Los trabajos realizados en humanos sugieren procesos similares, medidos a través de técnicas de imagen como la resonancia magnética funcional (fMRI) o la tomografía por emisión de positrones (PET) (46). En estos estudios se pide a los sujetos que realicen tareas similares a la antes descrita para los monos y se mide su actividad cerebral en los periodos de retención, y aunque los datos no concuerdan al 100% con los de los primates no humanos, se discute que estas diferencias podrían deberse a las limitaciones de las técnicas de medición, esto es, que las técnicas de imagen no permiten la detallada resolución que se obtienen por las técnicas electrofisiológicas.

A pesar de las limitaciones de algunas de las técnicas de medición, los estudios electrofisiológicos (10) y los de imágenes (12) han mostrado que la corteza prefrontal es la encargada de mantener la información presente por periodos cortos de tiempo. Existe además otro tipo de evidencias que podrían contradecir estos resultados, como el hecho de que en algunos estudios se ha documentado que otras regiones como la corteza parietal presentan este mismo tipo de activación. Sin embargo, se ha mostrado también que en tareas en donde el mantenimiento de la información es necesario, las lesiones de la corteza parietal no tienen efectos, mientras que las lesiones en la corteza prefrontal sí (9).

Anticipación

La anticipación es otra de las funciones atribuidas a la corteza prefrontal. En diferentes estudios, se ha podido observar que la actividad de la corteza prefrontal aumenta su nivel de disparo momentos antes de realizar una acción (18, 47, 49). Es decir, parecería que la corteza prefrontal se adelantara a la acción o indicara la forma en que se va a responder.

Algunos de los estudios más importantes son los realizados por el grupo de Joaquín Fuster (49) y por Pochon y col. (47). En estos estudios, se presentaron pruebas a humanos y a macacos en las que las respuestas podían anticiparse o no. Ambos grupos han obtenido resultados similares. Es decir, algunas neuronas en las regiones correspondientes al área 46 presentaron una activación sostenida solamente cuando los sujetos podían preparar su respuesta.

Interacción con otros sistemas de memoria

Corteza prefrontal – hipocampo. Los primeros informes sobre las conexiones entre estas estructuras datan de la década de 1970. Por ejemplo, se ha mostrado que el *subiculum* proyecta a las diversas partes de la corteza prefrontal (52). También se han documentado conexio-

nes recíprocas entre el *subiculum* y la corteza prefrontal dorsolateral (23). Barbas y Blatt (4) han informado, por su parte, que no sólo el *subiculum* sino también la región CA1 del hipocampo proyecta a las regiones orbital y medial de la corteza prefrontal.

Además de la evidencia anatómica también existe un amplio acervo bibliográfico que describe, con evidencias electrofisiológicas, las interacciones entre el hipocampo y la corteza prefrontal (24, 60). En estos trabajos se plantea la hipótesis de una interacción entre el hipocampo y la corteza prefrontal para la consolidación de la memoria (7, 59).

Corteza prefrontal – estriado. Hay proyecciones desde la corteza prefrontal hacia la región dorso lateral del estriado que, como ya hemos comprobado, es importante para las asociaciones E-R, el aprendizaje de procedimientos y habilidades, y algunas tareas de discriminación. Sin embargo no existen muchos trabajos que se ocupen de la relación entre estas dos regiones para el control del aprendizaje y la memoria.

La evidencia experimental se ha enfocado principalmente en la interacción entre la corteza prefrontal y el estriado ventral o núcleo *accumbens* y su función en la regulación del reforzamiento de la conducta (27, 58).

Corteza prefrontal – amígdala. Como ya hemos mencionado, la amígdala interviene en aportar el componente emocional a la conducta. En este apartado tomaremos otra de las funciones propuestas para la amígdala, la expectativa del reforzador. Esta se define como la representación que un sujeto hace respecto a un reforzador y la asociación de esa representación con las condiciones en las que fue reforzado. En términos más simples, sería determinar el grado en que un sujeto prefiere un reforzador a otro. Este efecto puede medirse de diferentes formas, pero una muy adecuada fue la que propuso Rescorla, y básicamente consiste en poner a competir dos reforzadores y después someterlos a un programa de extinción. De esta forma, el que mostrara una mayor resistencia a la extinción sería considerado como el reforzador con mayor expectativa. Este efecto se conoce como devaluación del reforzador. Se ha mostrado que las lesiones en el núcleo basolateral de la amígdala así como las de la corteza prefrontal orbital interfieren con la devaluación del reforzador (26).

Se ha propuesto que la función de la amígdala en este tipo de tareas es la de codificar o aportar el componente emocional a las claves que anteceden al reforzador, mientras que la corteza orbitofrontal utiliza esta información para seleccionar la estrategia adecuada (57).

Como podemos observar, la red neuronal, el ensamblaje de sistemas que regulan nuestro aprendizaje,

el almacén de los recuerdos y la evocación de los mismos son algo muy amplio y complejo. Esta exquisita organización del cerebro y su enorme capacidad para generar estrategias, no tienen ningún sentido si no las ponemos en su contexto, es decir, la expresión de la estrategia adecuada ante las demandas de un medio ambiente cambiante y por lo mismo predecible sólo con un conocimiento detallado del aspecto del mundo al que queremos adaptarnos. Por ello, una actividad del cerebro igualmente fascinante que las reseñadas hasta ahora es la de elegir una estrategia dependiendo de la hora del día.

LOS SISTEMAS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA Y EL CICLO DE LUZ-OSCURIDAD

En las secciones anteriores hemos intentado resumir la forma en que funcionan los diferentes sistemas de memoria, hemos tratado de mostrar que participan diferencialmente en el procesamiento de la información. En condiciones normales, estos sistemas interactúan para producir una conducta específica; sin embargo, esta interacción aún no es del todo clara. En esta sección mostraremos evidencia de la influencia que ejerce el medio ambiente en el funcionamiento global del cerebro y de cómo podría ser un factor que influyera en la forma en que estos sistemas interactúan entre sí.

El medio ambiente determina de forma muy importante varios de los aspectos de nuestra vida. Por ejemplo, se ha mostrado que la interacción entre el medio ambiente y el cerebro es fundamental en el correcto desarrollo de la vía visual en etapas tempranas (56). En esta sección pondremos énfasis en uno de los componentes del medio ambiente, el ciclo luz-oscuridad, revisaremos las evidencias que demuestran que los cerebros de diversos mamíferos funcionan de distinta manera a lo largo del día y que estas diferencias se reflejan en la conducta.

En 1975 Folkard (15) mostró que sujetos humanos entrenados en una tarea específica cambiaban su modo de resolver el problema sin afectar el resultado final, en formas dependientes del ciclo luz-oscuridad. En este estudio se sugiere que los sujetos varían la estrategia con la que resuelven un problema en una forma dependiente del ciclo luz-oscuridad. Esta fue una de las primeras aproximaciones al problema.

Más adelante, Boulos y col. (5), mostraron que la conducta de palanqueo en ratas sometidas a un paradigma de autoestimulación eléctrica está sujeta a un ritmo circádico. Después, Yanovski y col. (62), demostraron que el ritmo que se presenta en esta tarea no depende de la percepción del reforzador, es decir, los

mecanismos para los ritmos circadianos modulan la conducta de acercamiento a un reforzador en un animal que lo percibe de la misma forma.

Los dos ejemplos anteriores mostraron que a pesar de que la expresión de la conducta guiada hacia un objetivo estuviera sujeta a variaciones diurnas, aquello que motivaba la conducta permanecía intacto a través del ciclo luz-oscuridad. En su estudio, Folkard (15) muestra que los sujetos, a pesar de aproximarse con una estrategia diferente a la solución del problema, siguen resolviéndolo eficientemente. Por otro lado, Yanovski (62) muestra que pese a que la conducta varíe, el reforzador produce el mismo efecto recompensante a cualquier hora del día.

Los estudios anteriores sugieren que diferentes regiones cerebrales son afectadas diferencialmente por las variaciones diurnas. Es decir, el hecho de que la conducta varíe, mientras el valor subjetivo que se da al reforzador no cambie, podría indicar que los mecanismos efectores de la conducta están sujetos a las variaciones del medio ambiente, mientras que los objetivos específicos para los que se despliegan las diferentes conductas permanecen sin cambios.

Estudios electrofisiológicos han buscado encontrar una relación entre la actividad neuronal de zonas específicas como el hipocampo y el ciclo luz-oscuridad. Por ejemplo, algunos grupos han medido la excitabilidad de diferentes regiones del hipocampo de ratas (8, 25) y ratones (50). En estos trabajos se mostró que la espiga poblacional y los potenciales postsinápticos excitadores tienen una dependencia del ciclo luz-oscuridad. También se han valorado otros indicadores de la actividad diferencial dependiente del ciclo luz-oscuridad en estructuras como la corteza prefrontal o el núcleo estriado. Por ejemplo, Brunel y Montigny (6), realizaron un experimento en el que midieron el pegado de GABA, acetilcolina, serotonina y norepinefrina en células glutamatérgicas hipocámpales en diferentes puntos del ciclo luz-oscuridad. En este estudio se demostró que existía una variación diurna para el pegado de todos los neurotransmisores mencionados exceptuando el GABA, lo que sugiere que la existencia de receptores membranales específicos a los neurotransmisores varía a lo largo del día. Adicionalmente sugiere que la expresión de los genes que los codifican varía también, quizá en estrecha dependencia de la presencia de luz solar.

Por otro lado se ha podido demostrar que la liberación de acetilcolina en el hipocampo (41) y en la corteza prefrontal (40) de ratas muestra variaciones diurnas. La acetilcolina que se libera tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal proviene principalmente del cerebro basal anterior. Su función en estas estructuras es modular la excitabilidad de las células

principales que en ambos casos son glutamatérgicas. Estos resultados sugieren que la modulación por actividad colinérgica en estas estructuras es dependiente del ciclo luz-oscuridad. Por lo tanto, la conducta que, como hemos visto, es generada por estas estructuras, consecuentemente tiene que verse afectada diferencialmente.

Además de los estudios electrofisiológicos y bioquímicos, recientemente se han realizado estudios conductuales. Se ha mostrado, que en el laberinto acuático de Morris, la adquisición de una tarea dependiente del hipocampo no es afectada por la disrupción de los ciclos, sin embargo la recuperación de la tarea sí (13). Ralph y col. (51) muestran resultados similares. En su estudio, la retención de una tarea de preferencia de lugar depende de la fase del ciclo en la que los sujetos fueron entrenados. Esto es, cuando se requería que los sujetos recuperaran la información en la fase del ciclo en la que no habían sido entrenados, mostraban problemas en la ejecución.

En otro estudio, se observó el efecto del ciclo en ratones entrenados en una tarea de condicionamiento de miedo. Los resultados indicaron que los sujetos adquirirían la tarea con mayor facilidad cuando eran entrenados durante la fase de luz y la conducta mostraba una mayor resistencia a la extinción (11).

Recientemente en un estudio en humanos, se pidió a los sujetos que resolvieran tareas de memoria explícita e implícita en dos puntos del ciclo luz-oscuridad. Lo más destacado del estudio es que los sujetos mostraban un mejor desempeño para la tarea explícita en una hora del día y para la memoria implícita en la hora contraria (33). Estos investigadores sugieren que los mecanismos para la recuperación de la memoria explícita e implícita se encuentran sujetos a “agendas circádicas” distintas.

Estos resultados concuerdan con los de nuestro propio grupo, en los que sometimos a ratas a una tarea de orientación espacial en la que podíamos valorar dos tipos diferentes de estrategias para resolver la prueba (54). En este trabajo mostramos que los sujetos entrenados durante la fase de luz resuelven la prueba mediante una estrategia espacial (relacionada principalmente con el hipocampo) mientras que los sujetos entrenados durante la fase de oscuridad resuelven la tarea con una estrategia serial (relacionada principalmente con el estriado).

Hemos mostrado diferentes estudios en los que distintos componentes de los mecanismos que generan la conducta se ven afectados por el ciclo luz-oscuridad. También hemos mostrado cómo la ejecución de tareas de aprendizaje está sujeta a esta agenda. Los últimos estudios revisados sugieren que diferentes regiones cerebrales podrían estar sujetas a diferentes “relojes” y, por lo tanto, el balance en la interacción para

producir una conducta sería diferente a lo largo del ciclo. El balance en la participación de las diferentes estructuras estaría sujeto a las condiciones del medio.

Aún no sabemos exactamente cómo es que los diferentes sistemas de memoria interactúan para producir un tipo de conducta determinado. Sin embargo, hasta ahora podemos identificar que éstos se encuentran relacionados con el procesamiento y el almacenamiento de diferentes características de la estimulación que llega todo el tiempo. También podemos decir que su ausencia o mal funcionamiento impide la expresión de ciertos componentes de la conducta pero no produce la ausencia total de la misma.

Por otro lado, tenemos bombardeados constantemente a estos sistemas de memoria por las condiciones del medio en el que se encuentran. En este sentido, el ciclo luz-oscuridad es uno de los componentes del medio ambiente más evidente una estimulación constante y además significativa para los sistemas de memoria, como lo indican algunos datos que hasta el momento hemos revisado. La elección de una estrategia depende de la interacción de los diferentes sistemas de memoria. Al parecer el medio ambiente modula selectivamente a los diferentes sistemas de memoria produciendo así un balance diferencial dependiendo de las condiciones del medio.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo del donativo 42060 del CONACYT, otorgado a OPG. Todas las ilustraciones son obra del licenciado Benito Moreno Gómez.

REFERENCIAS

1. AMMASSARI-TEULE M, MARSANICH B: Spatial and visual discrimination learning in CD1 mice: partial analogy between the effect of lesions to the hippocampus and the amygdala. *Physiol Behav*, 60:256-71, 1996.
2. BADDELEY A: Working memory: Looking back and looking forward. *Nature Reviews*, 4:829-39, 2003.
3. BADDLEY A: Modulatory, mass-action and memory. *Q J Exp Psychol A*, 38:527-33, 1986.
4. BARBAS H, BLATT GJ: Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus*, 5: 511-33, 1995.
5. BOULOS Z, ROSENWASSER AM, TERMAN M: Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res*, 1:39-45, 1980.
6. BRUNEL S, MONTIGNY C: Diurnal rhythms in the responsiveness of hippocampal pyramidal neurons to serotonin, noradrenaline, gamma aminobutyric acid and acetylcholine. *Brain Res Bull*, 18:205-12, 1987.
7. BUZSAKI G: Two-stage model of memory trace formation: a role for “noisy” brain states. *Neuroscience*, 31: 551-570, 1989.
8. CAULLER LJ, BOULOS Z, GODDARD GV: Circadian rhythms in hippocampal responsiveness to perforant path sti-

- mulation and their relation to behavioral state. *Brain Res*, 329:117-130, 1985.
9. CHAFEE MV, GOLDMAN-RAKIC PS: Inactivation of parietal and prefrontal cortex reveals interdependence of neural activity during memory-guided saccades. *J Neurophysiol*, 83:1550-66, 2000.
 10. CHAFEE MV, GOLDMAN-RAKIC PS: Matching patterns of activity in primate prefrontal area 8a and parietal area 7ip neurons during a spatial working memory task. *J Neurophysiol*, 79:2919-40, 1998.
 11. CHAUDHURY D, COLWELL CS: Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res*, 133:95-108, 2002.
 12. COURTNEY SM, PETT L, MAISOG JM, UNGERLEIDER LG, HAXABY JV: An area specialized for working memory in human frontal cortex. *Science*, 279:1347-51, 1998.
 13. DEVAN BD, GOAD EH, PETRI HL, ANTONIADIS EA, HONG NS, KO CH y cols.: Circadian phase-shifted rats show normal acquisition but impaired long-term retention of place information in the water task. *Neurobiol Learning Memory*, 75:51-62, 2001.
 14. DUNCAN J, SEITZ RJ, KOLODNY J, BOR D y cols.: A neural basis for general intelligence. *Science*, 289:457-60, 2000.
 15. FOLKARD S: Diurnal variation in logical reasoning. *Br J Psychol*, 66:1-8, 1975.
 16. FUNAHASHI S, BRUCE CJ, GOLDMAN-RAKIC PS: Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol*, 61:331-49, 1989.
 17. FUNAHASHI S: Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex. *Neuroscience Res*, 39:147-65, 2001.
 18. FUSTER JM: Executive frontal functions. *Exp Brain Res*, 133:66-70, 2000.
 19. FUSTER JM: Frontal lobe and cognitive development. *J Neurocytology*, 31:373-85, 2002.
 20. FUSTER JM: The prefrontal cortex – An update: Time is of the essence. *Neuron*, 30:319-333, 2001.
 21. GALLAGHER M, KAPP BS, MUSTY RE, DRISCOLL PA: Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. *Science*, 198:423-5, 1977.
 22. GOLD PE, STERNBERG DB: Retrograde amnesia produced by several treatments: evidence for a common neurobiological mechanism. *Science*, 201:376-9, 1978.
 23. GOLDMAN-RAKIC PS, SELEMON LD, SCHWARTZ ML: Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience*, 12:719-43, 1984.
 24. GRAY TS: Functional and anatomical relationships among the amygdala, basal forebrain, ventral striatum, and cortex. *Ann N Y Acad Sci*, 29:877-44, 1999.
 25. HARRIS KM, TEYLER TJ: Age differences in a circadian influence on hippocampal LTP. *Brain Res*, 261:60-73, 1983.
 26. HOLLAND PC, GALLAGER M: Amygdala-frontal interactions and reward expectancy. *Curr Opin Neurobiol*, 14:148-155, 2004.
 27. KELLEY AE, ANDRZEJEWSKI ME, BALDWIN AE, HERNANDEZ PJ, WAYNE EP: Glutamate-mediated plasticity in corticostriatal networks. *Am NY Acad Sci*, 1003:159-68, 2003.
 28. KIM JJ, LEE HJ, HAN JS, PACKARD MG: Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J Neurosci*, 21:5222-8, 2001.
 29. KIM JJ, RISON RA, FANSELOW MS: Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short-and long-term contextual fear. *Behav Neurosci*, 107:1093-8, 1993.
 30. LORENZINI CA, BUCHERELLI C, GIACHETTI, TASSONI G: Conditioned freezing (generalized motor inhibition) in several rat strains: its usefulness in assessing somato-vegetative responses to nociceptive stress. *Funct Neurol*, 5:267-71, 1990.
 31. MAREN S, QUIRK GJ: Neuronal signaling of fear memory. *Nat Rev Neurosci*, 5:844-52, 2003.
 32. MAREN S: Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *TINS*, 22:561-67, 1999.
 33. MAY CP, HASHER L, FOONG N: Implicit memory, age, and time of day. *Psychol Sci*, 16:96-100, 2005.
 34. McDONALD RJ, HONG NS: A dissociation of dorsolateral striatum and amygdala function on the same stimulus-response habit task. *Neuroscience*, 124:507-13, 2004.
 35. McDONALD RJ, WHITE NM: A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci*, 107:3-22, 1993.
 36. McGAUGH JL, McINTYRE CK, POWER AE: Amygdala modulation of memory consolidation with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem*, 8:539-552, 2002.
 37. McGAUGH JL: Memory- a century of consolidation. *Science*, 287:248-251, 2000.
 38. McGAUGH JL: The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci*, 27:1-28, 2004.
 39. McINTYRE CK, POWER AE, ROOZENDAAL B, McGAUGH JL: Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann N Y Acad Sci*, 985:273-93, 2003.
 40. MITSUSHIMA D, YAMANOI C, KIMURA F: Restriction of environmental space attenuates locomotor activity and hippocampal acetylcholine release in male rats. *Brain Res*, 805:207-12, 1998.
 41. MIZUNO T, ARITA J, KIMURA F: Spontaneous acetylcholine release in the hippocampus exhibits a diurnal variation in both young and old rats. *Neurosci Lett*, 12:271-4, 1994.
 42. PACKARD MG, CAHILL L, McGAUGH JL: Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:8477-81, 1994.
 43. PACKARD MG, TEATHER LA: Amygdala modulation of multiple memory systems: Hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem*, 69:163-203, 1998.
 44. PARE D: Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Progress Neurobiol*, 70:409-20, 2003.
 45. PARENT MB, McGAUGH JL: Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Res*, 661:97-103, 1994.
 46. PASSINGHAM D, SAKAI K: The prefrontal cortex and working memory: physiology and brain imaging. *Curr Opin Neurobiol*, 14:163-8, 2004.
 47. POCHON JB, LEVY R, POLINE JB, CROZIER S y cols.: The role of dorsolateral prefrontal cortex in the preparation of forthcoming actions: an fMRI study. *Cerebral Cortex*, 11:260-266, 2001.
 48. PRATT WE, MIZUMORI SJ: Characteristics of basolateral amygdala neuronal firing on a spatial memory task involving differential reward. *Behav Neurosci*, 112:554-70, 1998.
 49. QUINTANA J, FUSTER JM: From perception to action: temporal integrative functions of prefrontal and parietal neurons. *Cerebral Cortex*, 9:213-21, 1999.
 50. RAGHAVAN AV, HOROWITZ JM, FULLER CA: Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice. *Brain Res*, 833:311-4, 1999.
 51. RALPH MR, KO CH, ANTONIADIS AE, SECO P y cols.: The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behav Brain Res*, 136:179-84, 2002.
 52. ROSENE DL, VAN HOESEN GW: Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. *Science*, 197:317-7, 1997.
 53. RUDY JW, HUFF NC, MATUS-AMAT P: Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev*, 28:675-685, 2004.

54. RUEDA P, QUIROZ-TORRES AM, MARTINEZ-VARGAS M, PROSPERO-GARCIA O: Endocannabinoid effects on memory depend on diurnal variations. 32 Annual meeting of the Society for Neuroscience, Orlando, 2002.
55. SAH P, FABER ESL, LOPEZ DE ARMENTIA M, POWER J: The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, 83:803-34, 2003.
56. SHATZ C: The developing brain. *Scientific American*, 267:60-7, 1992.
57. SHOENBAUM G, CHIBA AA, GALLAGER M: Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *J Neuroscience*, 19:1876-84, 1999.
58. SHULTZ W: Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr Opin Neurobiol*, 14:139-47, 2004.
59. SIROTA A, CSICSVARI J, BUHL D, BUZSAKI G: Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:2065-2069, 2003.
60. THIERRY AM, GIOANNI Y, DEGENETAIS E, GLOWINSKI J: Hippocampo-Prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*, 10:411-419, 2000.
61. VAZDARJANOVA A, MCGAUGH JL: Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *J Neurosci*, 19:6615-22, 1999.
62. YANOVSKY JA, ADLER NT, GALLISTEL CR: Does the perception of reward magnitude of self-administered electrical brain stimulation have a circadian rhythm? *Behav Neuroscience*, 6:888-93, 1986.
63. YERKES RM, DODSON JD: The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *J Comp Neurol Psych*, 18:459-482, 1908.