



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“MECANISMOS MOLECULARES DE LA MEMORIA
ESPACIAL EN EL HIPOCAMPO DORSAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LEONARDO RAMOS BARBOSA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE
México D.F. abril 2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Ramos
Barbosa
Leonardo
57 33 14 27
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
303201281

2. Datos del tutor

Dra.
Paola
García
de la Torre

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Federico
Bermúdez
Rattoni

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Manuel
Miranda
Anaya

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Julio Eduardo
Roque
Morán
Andrade

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Enrique
Moreno
Sáenz

7. Datos del trabajo escrito

Mecanismos moleculares de la memoria espacial en el hipocampo dorsal
48 p.
2014

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a un finito de personas que me acompañaron de cerca y que de manera directa e indirectamente me apoyaron constantemente en el encauzamiento del presente trabajo.

Como agradecimiento libre, me gustaría externar mi fascinación por la gama tan extensa de vida biológica y las diferentes formas en que esta se ha manifestado durante millones de años en el planeta Tierra; que fue lo que me impulsó desde temprana edad al mundo de esta maravillosa ciencia, la de la Biología.

Con este impulso inicial, agradezco a mis padres por su confianza y apoyo para estudiar la Licenciatura en Biología en la Facultad de Ciencias, UNAM; y centrar mi interés en la maravillosa rama de la Neurobiología, y en consecuencia la elaboración del trabajo de Tesis titulado *Mecanismos Moleculares de la Memoria Espacial en el Hipocampo Dorsal*.

Agradezco a mis amigos y compañeros del laboratorio de Memoria y Aprendizaje del Instituto de Fisiología Celular y, con aprecio al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, quién me permitió realizar este trabajo en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Reconozco con afecto a mi tutora Paola García de la Torre, quien con optimismo y fascinación por los procesos neuronales subyacentes en la memoria, me motivó desde la primera presentación en la Facultad de Ciencias —que como una hormiga cuando detecta una feromona, la del conocimiento— a pertenecer a su grupo de trabajo. Cabe reconocer que su aptitud en el laboratorio y personalidad paciente fueron elementos que enriquecieron su asesoría oportuna a mis dudas e inquietudes siempre latentes.

También al personal del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, al encargado del mantenimiento de las ratas y de limpieza, quienes me apoyaron en la logística de este estudio.

Resalto mi agradecimiento por el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 155242, y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN209412124.

INDICE

Resumen

I.	INTRODUCCIÓN	8
1.1.	Memoria	9
1.2.	Clasificación de la memoria	9
1.3.	Amnesia	13
1.4.	Consolidación de la memoria.....	15
1.5.	Reconsolidación: la memoria como un modelo dinámico.....	15
1.6.	Memoria espacial	17
1.7.	Hipocampo	19
1.8.	Reconsolidación en la memoria espacial	22
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPOTESIS, OBJETIVO ..	24
2.1	Planteamiento del problema	24
2.2	Hipótesis	25
2.3	Objetivo general	26
2.4	Objetivos particulares	26
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	Animales	27
3.2.	Procedimiento conductual	27
3.2.1.	Laberinto Acuático de Morris	27
3.2.2.	Protocolo	27
3.2.3.	Cirugía y microinyección	28
3.2.4.	Fármacos	28
3.2.5.	Histología	29
3.3.	Análisis estadístico	30

IV.	RESULTADOS	31
4.1.	Histología	31
4.2.	Adquisición de la tarea del Laberinto Acuático de Morris	31
4.3.	rGABA _A en la evocación de la memoria espacial	32
4.4.	Participación de los receptores NMDA en la evocación de la memoria espacial	33
V.	DISCUSIÓN	35
5.1.	Receptores GABAérgicos del hipocampo dorsal en la evocación de la memoria espacial	35
5.2.	Los rNMDA en la evocación de la memoria espacial.....	37
VI.	CONCLUSIÓN	40
VII.	LITERATURA CITADA.....	42

RESUMEN

El estudio de la memoria es en esencia el estudio de su evocación, etapa en la que existe la retención y por ello que el recuerdo tiene lugar. La evidencia experimental indica que el hipocampo es una estructura importante para la evocación de la memoria, en particular, la memoria espacial. Una de las tareas conductuales más usadas como una herramienta en el estudio de la memoria espacial, es el Laberinto Acuático de Morris (LAM). Con este paradigma conductual se ha demostrado que el hipocampo es la región responsable de la evocación de la memoria espacial. Asimismo, la actividad de los receptores NMDA se ha visto relacionada con varios procesos y etapas de la memoria, en la sinaptogénesis y la actividad de las células de lugar del hipocampo dorsal, así como en el proceso de consolidación y reconsolidación de la memoria espacial. En el presente trabajo se exploró el papel que desempeñan tanto la transmisión GABAérgica como la glutamatérgica, la derivada de los receptores NMDA (rNMDA), en el hipocampo dorsal durante la evocación de la memoria espacial y sus efectos sobre la reconsolidación de esta memoria. Para ello, se entrenaron a ratas de la cepa Wistar en el paradigma conductual del LAM. En una sesión de evocación llevada a cabo 24 horas después del último ensayo, se difundió a un grupo de ratas muscimol y, a otro D,L-APV 15 minutos antes de esta sesión y a un tercer grupo D,L-APV inmediatamente después, cada grupo con sus respectivos controles. Se observó, que la activación de los receptores GABA tipo A (rGABA_A) impide la evocación de la memoria, sin afectar la reconsolidación de la misma. Mientras que la inactivación de los rNMDA antes de la sesión de evocación afecta la evocación de la memoria espacial, no así la reconsolidación de la memoria. Estos resultados, permitieron concluir, que la activación de los rGABA_A o la inhibición de los rNMDA durante la evocación de la memoria espacial afectan la evocación de la memoria espacial, pero no su reconsolidación.

I. INTRODUCCIÓN

La memoria es un proceso biológico que permite generar conductas relativamente complejas tanto en organismos unicelulares como en pluricelulares, por lo que, la presencia de un sistema nervioso no es necesario para el comportamiento adaptativo. Por ejemplo, en algunos protozoarios del género *Paramecium* y *Amoeba*, tanto la entrada de impulsos y el procesamiento de la información como la salida de respuesta, corre a cargo de la misma célula cuando se trata de asociar la ubicación del alimento con la presencia de luz u oscuridad (Rosell *et al.*, 2002; Thompson, 2000).

En cambio, en organismos pluricelulares tanto de invertebrados como de vertebrados, el tejido neural controla y regula los procesos fisiológicos que, de una manera voluntaria o involuntaria, permiten procesar información relevante proveniente del medio interno o externo (Rosell *et al.*, 2002). Este tejido nervioso deriva de la hoja externa embrionaria blastodérmica (ectodermo). Por su parte, la célula nerviosa surgió aproximadamente hace 635 y 542 millones de años anterior al periodo Cámbrico, en el período Ediacareense ya en la era Neoproterozoica (Sarnat *et al.*, 1976). La aparición y desarrollo de este tejido nervioso en diversos sistemas vivos permitió reconocer, integrar y procesar mayor cantidad de información proveniente del medio interno y externo, incrementando la probabilidad de completar los ciclos de vida en condiciones ambientales particulares (de la Fuente y Álvarez Leefmans, 2006). A partir de las características funcionales de este tejido, emergió otra propiedad funcional: **la memoria.**

1.1 Memoria.

Memoria se refiere a la capacidad de adquirir, almacenar y evocar información procesada en el tejido nervioso (Morris y Frey, 1997). La memoria se forma en función de la adquisición de nueva información y ésta puede ocasionar cambios en el comportamiento del organismo lo que nos permite medirla (Purves *et al.*, 2004).

Con el fin de estudiar los procesos involucrados en la permanencia y actualización de la memoria se ha planteado el diseño de protocolos experimentales que permiten explorar los mecanismos que la subyacen. Los primeros estudios sobre la memoria aparecieron en los reportes de Bennett (1964 en Rosenzweig y Bennet, 1972), en los que observaron a *grosso modo* que un ambiente enriquecido provocaba en los roedores, cambios pronunciados en el tamaño de sus cerebros y contenido de proteínas (Izquierdo y Medina, 1997).

A la par con la práctica experimental, se plantearon y comprobaron hipótesis en relación al funcionamiento de la memoria. La memoria fue caracterizada y posteriormente clasificada para un mejor entendimiento de su funcionamiento (Castrillon, 2002).

1.2 Clasificación de la memoria.

La memoria, en función del tiempo que permanece almacenada, se clasificó en memoria de corto plazo y memoria de largo plazo (Morris y Frey, 1997; Morris, 2006). La memoria de corto plazo tiene una duración que va de minutos a horas, a nivel molecular, ocurren modificaciones covalentes entre proteínas preexistentes, como las cinasas, las cuales a través de estos cambios, permiten la interacción entre proteínas. Por otra parte, la memoria a largo plazo tiene una duración de días, semanas o años e involucra la activación de la expresión génica, síntesis de nuevas proteínas y de ARNm, la activación de PKA (Protein kinase A), MAPK

(Mitogen-activated protein kinases) (Kandel, 2001), y la transcripción y traducción de CREB (Ca²⁺ -response-element-binding protein); elementos que permiten su almacenamiento a largo plazo (Routtenberg y Rekart, 2005; Hawkins *et al.*, 2006) como se resume en la figura 1.

La memoria a largo plazo modifica la cantidad de proteínas de adhesión celular, y en consecuencia cambios morfológicos y estructurales en las sinapsis, tales como el crecimiento y el acortamiento o pérdida en el número de espinas dendríticas. A este conjunto de cambios se les conoce como plasticidad sináptica (Izquierdo y Medina, 1997) y son los que permiten la permanencia de la memoria a largo plazo (Ramírez-Amaya *et al.*, 2001).

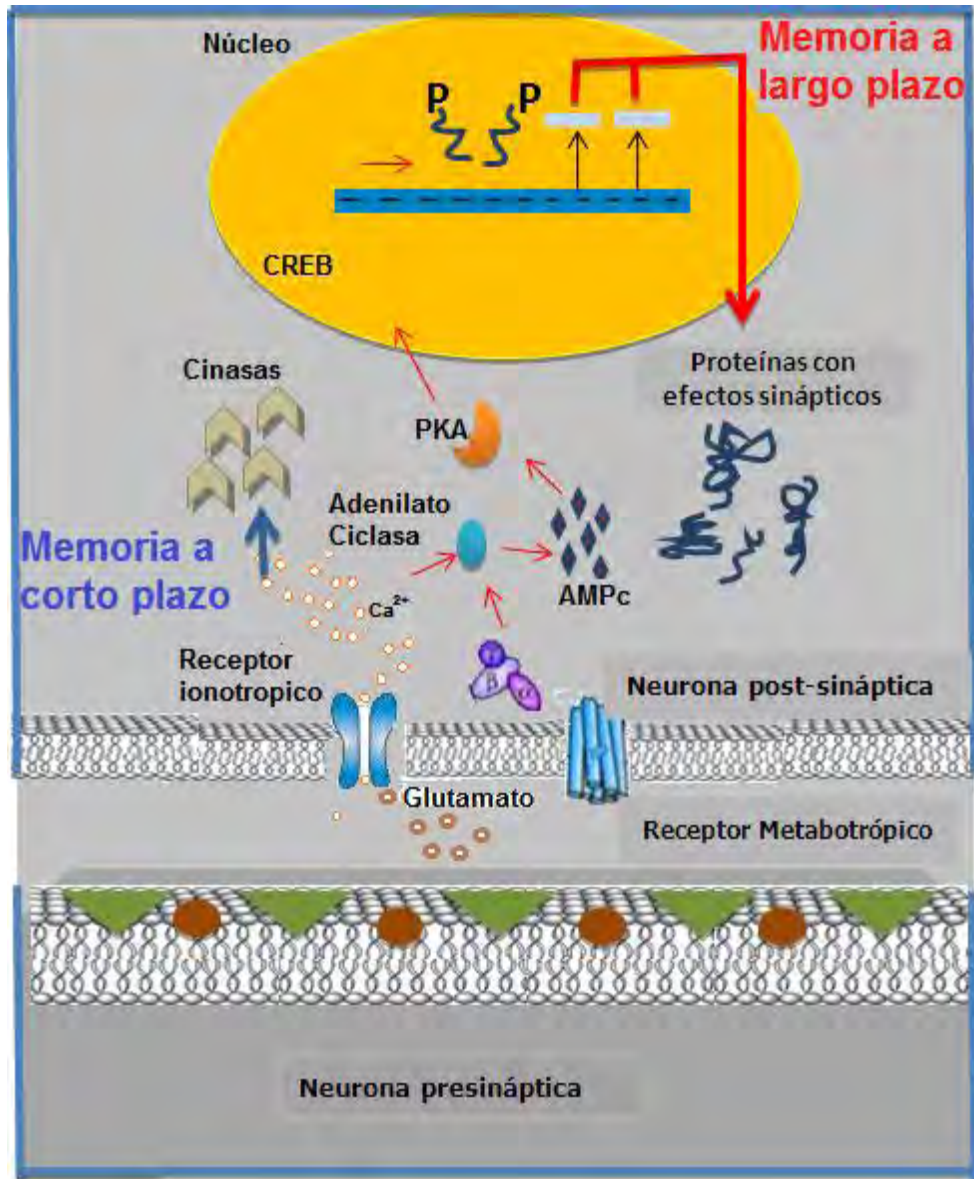


Figura 1. Tomado de Hawkins *et al.*, 2006 y Kandel, 2001. Representación esquemática de las cascadas intracelulares relacionadas con la formación de la memoria a corto y a largo plazo. **Memoria a corto plazo.** A partir de la apertura del receptor ionotrópico a glutamato se incrementa la permeabilidad de los iones, entre ellos, el calcio. El incremento intracelular de calcio intracelular desencadena la activación de cinasas y con ello su fosforilación. **Memoria a largo plazo.** La activación tanto de receptores ionotrópicos como metabotrópicos vía la unión de sus ligandos, incrementa la concentración de AMP cíclico, quien activa a PKA, este a CREB y con ello se permite la transcripción y la posterior síntesis *de novo* de proteínas, relacionadas con la actividad, reforzamiento y creación de nuevas conexiones sinápticas.

Cualitativamente, el almacenamiento de la información puede ser dividido en memoria declarativa y no declarativa, como se sintetiza en la figura 2. La memoria declarativa, también llamada explícita, se refiere al almacenamiento de

información disponible a la conciencia como son las memorias concernientes a personas, objetos o eventos. La información de este tipo de memoria es incorporada a un contexto por la coordinación entre las estructuras límbicas (Mesulan, 1998). Dentro de las memorias declarativas, se encuentra la memoria episódica, que se refiere al recuerdo de sucesos específicos que pueden ser asignados a un momento concreto en el tiempo. Es almacenada de manera asociativa y se recuerda en forma de eventos que ocurren en lugares y tiempos específicos (Morris y Frey, 1997; Thompson, 2000; Tulving, 1972), está relacionada con la memoria espacial y el contexto temporal (Shapiro, 2001).

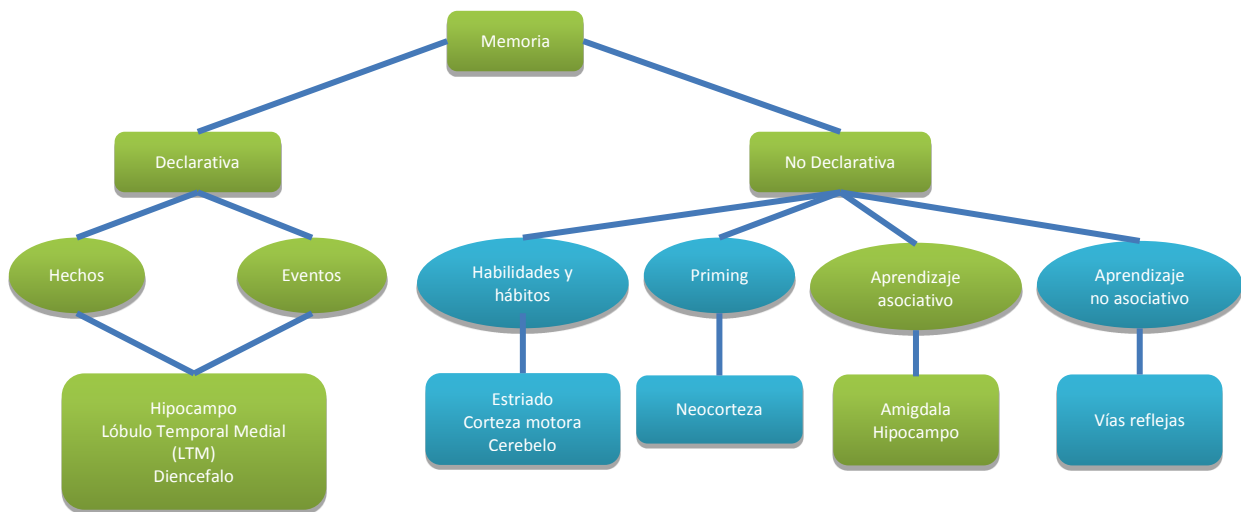


Figura 2. Tomado de Thompson, 2000. Clasificación tentativa de los tipos de memoria a largo plazo y su relación funcional con ciertas estructuras del cerebro.

Los procesos hasta ahora descritos que subyacen a todos estos tipos de memoria a largo plazo son la adquisición, la consolidación y la evocación (Quirk y Mueller, 2007). En la adquisición ocurre un cambio de conducta derivado de la fijación de la representación de lo aprendido. En la consolidación, el aprendizaje adquirido se estabiliza, mientras que en la evocación, la memoria previamente consolidada es expresada por el organismo. (Dudai, 2002; Rozenzweig y Leiman, 1992).

1.3 Amnesia

El estudio de la memoria es en esencia, el estudio de su evocación, tal como apuntaba William James “es la prueba de que existe la retención, y es por ello que el recuerdo tiene lugar”. Evocar es una actividad similar a percibir en el sentido, que involucra la aprehensión y comprensión del estímulo actual a la luz de la experiencia pasada (Sara, 2000). Los avances en el estudio de la memoria, derivan en gran parte de la observación e inducción de su ausencia, es decir, de la generación de amnesia (Majchrzak y Di Scala, 2000).

La amnesia se define como la incapacidad de aprender nueva información o evocar la información que previamente ha sido adquirida (Sara, 2000). Por estas características, la amnesia ha sido una forma de estudiar los mecanismos de la memoria. Los avances iniciales en este campo, comenzaron con la observación de la pérdida de memoria (reciente y remota) en pacientes que presentaban lesiones en el lóbulo temporal medial (LTM). El caso más estudiado fue el del paciente Henry Gustav Molaison (H.M.) a quien se le removió bilateralmente parte del LTM con el fin de evitar ataques epilépticos. Tras su operación, H.M. perdió la capacidad de formar nuevas memorias, además de perder la memoria extendida 11 años atrás a partir de su operación (amnesia retrógrada) especialmente memorias declarativas. Estas observaciones dieron pie a concluir que la expresión de la memoria declarativa, almacenamiento y evocación de la misma depende del LTM.

Se hizo evidente que la variación temporal de la amnesia retrógrada estaba relacionada con la extensión de la lesión. Por ejemplo, en pacientes con daños más extensos del LTM se observó una amnesia que abarcaba 15 años posteriores a la operación; en dos pacientes con lesiones en la región CA1 del hipocampo se detectó amnesia retrógrada que se extendió 1 ó 2 años atrás. Estas evidencias de amnesia retrógrada permitieron afirmar que la función del hipocampo estaba

relacionada con el almacenamiento temporal de nueva información y evocación de memorias declarativas en humanos (Frankland y Bontempi, 2005).

Asimismo, desde hace 50 años, numerosos estudios han proveído de información acerca del funcionamiento de la memoria, experimentando con diferentes especies animales y usando diferentes paradigmas conductuales e inhibidores proteínicos (Davis y Square, 1984).

El uso de agonistas y antagonistas enzimáticos a diferentes tiempos en el proceso de memoria, en áreas específicas del cerebro y en modelos animales permitió inferir relaciones entre la conducta y la función cerebral en relación a los mecanismos involucrados en la memoria (Majchrzak y Di Scala, 2000; Nader y Hardt, 2009; Izquierdo y Medina, 1997). Desde inicios de 1960 y hasta la actualidad se han publicado numerosos reportes donde la inhibición de la síntesis de proteínas antes y tiempo después de un entrenamiento conductual causa amnesia.

En años recientes la inducción de amnesia generó conocimientos e hipótesis sobre la formación y mecanismos que subyacen al almacenamiento de la memoria a largo plazo, y planteó una hipótesis que permitía explicar el funcionamiento del almacenamiento de la memoria. Georg Müller (siendo uno de los fundadores de la psicología experimental) defendía la idea de que las funciones mentales provenían de acciones materiales, como es el caso de la memoria y el aprendizaje. De esta manera Müller y Pilzecker reportaron 40 experimentos realizados entre 1892 y 1900, para identificar las leyes que gobernaban la formación y evocación de la memoria (Lechner *et al.*, 1999).

Estos autores concluyeron que la fijación de la memoria requiere del paso del tiempo (consolidación) y que el aprendizaje es vulnerable durante este período (de consolidación) puesto que se observó un cuadro amnésico cuando se interfería con el funcionamiento cerebral antes de que concluyera el proceso de

consolidación (Prado y Quirarte, 2007). Así, se reconoce a Müller y Pilzecker como los primeros que adoptaron el término **consolidación** para describir a aquellos procesos posteriores a la experiencia que permitían la estabilización de la memoria a largo plazo (Frankland y Bontempi, 2005; Wang y Morris, 2010).

1.4 Consolidación de la memoria.

La consolidación es un proceso de almacenamiento y estabilización de la memoria de corto a largo plazo que ocurre una sola vez. Hay dos mecanismos asociados a este proceso, la consolidación celular y la consolidación de sistemas. La consolidación celular es un mecanismo que incluye la síntesis *de novo* y captura de proteínas, la continua fosforilación de la proteína cinasa M ζ (PKM ζ) y la transcripción de CREB, que a su vez promueve la expresión de genes relacionados con la plasticidad sináptica (Suzuki *et al.*, 2004). Además, de acuerdo a los reportes de Tsien y colaboradores (1996) depende de la activación de los receptores NMDA cuyo papel principal radica en el reforzamiento sináptico que ocurre después de varios días.

La consolidación de sistemas en cambio, se refiere a la dinámica que ocurre entre poblaciones de neuronas interconectadas dentro de diferentes estructuras y entre las cuales está involucrado en gran medida el hipocampo (Morris, 2000; Morris *et al.*, 2003; Nader y Hardt, 2009).

1.5 Reconsolidación: la memoria como un modelo dinámico.

En 1968 Misanin y colaboradores, reportaron que la aplicación de choques electroconvulsivos inmediatamente después de una sesión de evocación de la memoria de condicionamiento al miedo (previamente consolidada) generaba amnesia, no obstante, observaron que si el choque electroconvulsivo era

presentado solo, no se producía amnesia. Estos resultados permitieron concluir que la memoria previamente consolidada, al ser evocada, entraba a un estado más vulnerable y por lo tanto susceptible a agentes amnésicos durante este período. De acuerdo a esta explicación, se sugirió que el proceso de consolidación no era un evento estático, sino más bien dinámico, que ocurre más de una vez y que posteriormente fue denominado **reconsolidación** (Nader y Hardt, 2009).

La base empírica de la reconsolidación fue aportada por Misanin y colaboradores (1968), pero el término de *reconsolidación* fue introducido hasta 1973 por Spear (Nader *et al.*, 2000). Se basa en la hipótesis de que la evocación de una memoria previamente consolidada, permite que esta se vuelva vulnerable y entre a un estado de labilidad o desestabilidad (Pedreira, 2004). El concepto se retomó con el fin de explicar los efectos amnésicos que generaban ciertas drogas (Nader *et al.*, 2000) o un nuevo aprendizaje posterior a un evento de evocación (Forcato *et al.*, 2007).

Nader y colaboradores (2000) ofrecieron evidencia experimental del proceso de reconsolidación usando el paradigma conductual de condicionamiento al miedo. La tarea de condicionamiento al miedo consiste en el apareamiento de un estímulo condicionado (estímulo auditivo) y un estímulo incondicionado (un choque eléctrico en las patas). Los autores reportaron que la infusión de anisomicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) en la amígdala basolateral, después de una sesión de evocación de la memoria al miedo no afecta la memoria a corto plazo, pero sí la memoria a largo plazo. Sin embargo, en ausencia de la evocación de la memoria, la infusión del inhibidor de proteínas no tiene efecto sobre el aprendizaje. Estos resultados permitieron concluir que una sesión de evocación provoca que la memoria previamente consolidada regrese a un estado lábil y sea susceptible de ser interrumpida (Nader y Oliver 2009; Da Silva *et al.*, 2008; Forcato *et al.*, 2009).

Estos estudios reconocieron dos características de la reconsolidación: labilización de la memoria activada y especificidad de la estructura involucrada (Forcato *et al.*, 2009). Adicionalmente se reportó que la evocación de la memoria con la presentación del estímulo condicionado de corta duración sin el estímulo incondicionado, conduce a la memoria a un proceso de reconsolidación, pero si la presentación del estímulo condicionado se prolonga, ocurre la extinción de la tarea (Suzuki *et al.*, 2004; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2008). Derivado de otros trabajos, se ha identificado que la reconsolidación presenta mecanismos moleculares similares a los de la consolidación y aunque ambos requieren de síntesis de proteínas y la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta a calcio (CREB), la consolidación únicamente involucra la participación del factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), mientras que en la reconsolidación se recluta a Zif268, un factor de transcripción pero no a BDNF (Lee *et al.*, 2004). Así, la teoría de la reconsolidación explica que este es un proceso que permite integrar nueva información a una memoria previamente consolidada que permanece a largo plazo (Forcato *et al.*, 2009; Lee, 2008; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2007, 2008).

1.6 Memoria espacial

La memoria espacial es una memoria declarativa en mamíferos (Izquierdo y Medina, 1997), mediante la cual el cerebro almacena información referente a la ubicación física del o los objetos en el espacio (Purves *et al.*, 2004).

Esta memoria se relaciona con la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características espaciales y temporales del ambiente, lo que permite al organismo desenvolverse en el espacio. Consiste en múltiples mecanismos especializados, tales como codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y referencias espaciales, por lo que es importante para muchos de los repertorios conductuales de los animales:

búsqueda de comida, conducta parental y reproductiva, regreso al nido o huida a un lugar seguro (Vicens *et al.*, 2003).

Los roedores pueden adoptar cuatro formas principales de navegación: la de orientación, la de guía, la cartografía, y de la integración de la ruta. En la de orientación, los animales basan su búsqueda en movimientos para la solución de tareas espaciales aprendidas durante la ejecución de la tarea. En el aprendizaje de guía, aprenden asociaciones entre los estímulos señal y la meta. El aprendizaje cartográfico implica el uso de señales distales que los animales forman para hacer una representación de su entorno (mapa cognitivo) por el cual llegan a ubicar la meta. Por último, la integración de la ruta es un proceso de actualización de la información, que ocurre cuando las pistas ambientales no ofrecen información espacial suficiente, de manera que el animal usa pistas cinestésicas y señales vestibulares (Vicens *et al.*, 2003).

Una de las tareas conductuales más utilizadas como herramienta en el estudio de la memoria espacial, es el Laberinto Acuático de Morris (LAM) (Purves *et al.*, 2004). Este entrenamiento involucra el procesamiento de distintas entradas de información: la visual, la olfativa, la auditiva y la somatosensorial (Meiri y Roseblum, 1998). Los animales se guían por claves espaciales colocadas alrededor del cuarto, lo que involucra el desarrollo de una estrategia conductual y de un mapa espacial (Morris y Frey, 1997; Vicens *et al.*, 2003).

El LAM consiste en someter al animal a ensayos de máximo 60 segundos en una tina con claves espaciales en el exterior. El animal aprende a llegar a una plataforma sumergida mediante estas claves y conforme se incrementa el número de ensayos, disminuye el tiempo que tarda en llegar a la plataforma. La prueba de memoria consiste de 60 segundos de nado libre en la tina, en donde se puede medir latencia (tiempo que tarda en llegar al lugar en el que estaba la plataforma), tiempo en el cuadrante y número de cruces por el área en la que se encontraba la plataforma (Wang y Morris, 2010).

En relación a la memoria espacial, en 1978 O'Keefe y Nadel propusieron que el hipocampo podría ser la estructura cerebral a través de la cual se forma el mapa cognitivo que permite al animal navegar en el espacio. Por su parte, Eichenbaum y colaboradores (1989), propusieron que la función del hipocampo es importante para la representación de memorias que requieren hacer relaciones entre claves espaciales. De acuerdo a una revisión de O'Keefe y Nadel (1978) se sostiene la hipótesis de que el hipocampo está sumamente involucrado en el aprendizaje y formación de la memoria espacial. Por ejemplo, se ha observado que las ratas con lesiones en esta estructura muestran un déficit en tareas conductuales que involucran un aprendizaje espacial (Meiri y Roseblum, 1998). En particular, en la tarea conductual del LAM, se sabe que la actividad de las neuronas del hipocampo permiten localizar la plataforma sumergida (Morris y Frey, 1997).

1.7 Hipocampo.

El hipocampo tiene un aspecto similar entre los mamíferos, desde los monotremas hasta los primates y los humanos. Es una región relacionada con la corteza cerebral que se ubica al interior del lóbulo temporal medial. Es una estructura marginal y menos compleja que el resto de la corteza cerebral (Bear y Connor, 2002).

La parte principal del hipocampo se ubica en el segmento superior de la cara medial del lóbulo temporal. Ésta presenta dos capas delgadas de neuronas plegadas una sobre otra; una de las capas se denomina giro dentado y la otra cuerno de Ammon (CA) (Bear y Connor, 2002). El cuerno de Ammon es una capa que presenta cuatro divisiones (Bear y Connor, 2001), que comprende a las subdivisiones entre CA1 y CA4 (Andersen *et al.*, 2000).

Las neuronas del giro dentado prolongan sus axones (denominados fibras musgosas) hacia las neuronas de la región de CA3. Los axones de CA3 se extienden hasta el fornix, y el resto se proyecta formando la vía colateral de Schaffer, donde tienen sinapsis con las neuronas de CA1 (Bear y Connor, 2001). El giro dentado está formado por 3 capas; una *capa molecular* superficial con escasas interneuronas; una *capa granular* con abundantes células conocidas como células piramidales, que son pirámides pequeñas modificadas con un árbol dendrítico apical ramificado en la capa molecular en forma cónica con vértice en el soma y prácticamente no tienen dendritas basales. Hay diversas interneuronas entremezcladas. Las fibras musgosas de estas células salen del extremo interno del soma. Y finalmente, la *capa polimórfica* profunda, presenta interneuronas más grandes (Puelles *et al.*, 2008).

Específicamente la subregión CA3 presenta células con un claro árbol dendrítico que se dirige al centro del hipocampo hacia giro dentado. Las dendritas presentan numerosas espinas dendríticas, las cuales reciben inervación de terminales excitadoras. Los axones de estas subregiones emiten colaterales (también llamadas colaterales de Schaffer) que van a inervar a las células piramidales de CA1.

La subregión CA1 recibe entradas de la corteza entorrinal medial lateral y las separa por la vía colateral de Schaffer. Esta vía puede representar información relacionada con la ubicación espacial, así como de contextos familiares donde están ocurriendo los eventos. La segunda entrada de información hacia el hipocampo es la vía tri-sináptica que proviene de la capa II de la corteza entorrinal y llega al giro dentado, del giro dentado al área CA3 del hipocampo y de ahí a CA1 región en la cual CA3 influye en más de la mitad de este sector (Andersen *et al.*, 2000). Este circuito está involucrado en la representación de eventos incluyendo información acerca de secuencias. A partir de estas dos entradas se pueden generar en el hipocampo asociaciones tanto espaciales como de eventos (Morris, 2006). Estas conexiones se representan en la figura 3.

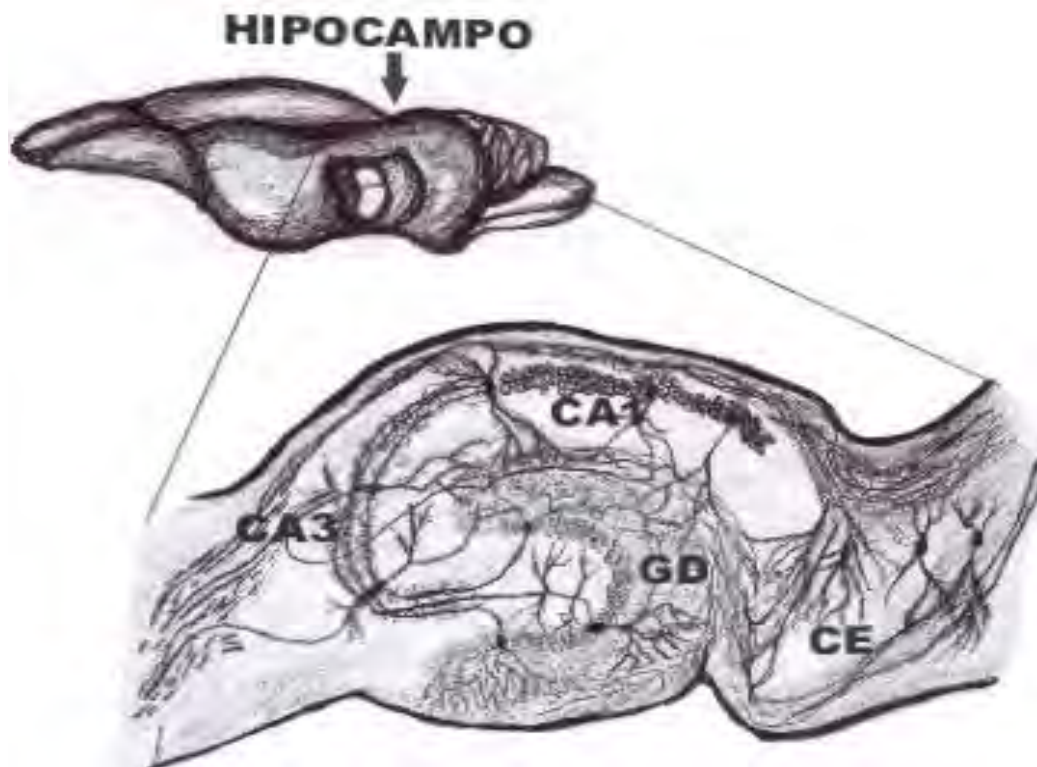


Figura 3. Ubicación del hipocampo dorsal en el cerebro de rata con proyección de la organización neuroanatómica y conexiones sinápticas del hipocampo entre la corteza entorrinal (CE), giro dentado (GD), CA1 y CA3 (Modificado de Morris, 2006)

La actividad neuronal derivada de la subregión CA3 permite que el aprendizaje de un mapa espacial se establezca después de 20 a 30 minutos (Morris *et al.*, 2003). La actividad de la región es necesaria para la adquisición (Artinian *et al.*, 2008), consolidación y evocación de esta memoria (Morris, 2006). Estructuralmente, las células piramidales de la subregión están conectadas en un 4% con células de la misma área (Morris, 2006). Funcionalmente permite la formación de redes de memorias relacionadas con la memoria episódica (Morris y Frey, 1997; Thompson, 2000) y espacial (Nakazawa *et al.*, 2002), ya que la interacción ocasiona que los eventos con características similares en tiempos y espacios específicos correspondan y se asocien (Leutgeb *et al.*, 2004; Morris y Frey, 1997). Por ello CA3, a diferencia de CA1 demora más tiempo en estabilizar un mapa espacial, puesto que recurre a interacciones con otras redes, mientras que CA1 estabiliza el mapa espacial de la información que proviene de la corteza entorrinal (Leutgeb *et al.*, 2004).

Moser y Moser (1998) reportaron que una pequeña porción del hipocampo dorsal (25%) es suficiente para adquirir una tarea espacial como el LAM. Asimismo, Ramírez-Amaya y colaboradores (1999) observaron una relación entre el desempeño de los roedores y cambios observados en la organización sináptica en las fibras musgosas del hipocampo en CA3. En 2001 este mismo autor mostró que la sinaptogénesis observada en esta zona hipocampal se relacionaba con la formación de la memoria a largo plazo. También, demostraron que la inactivación de los receptores NMDA en esta región antes de la adquisición de la tarea afectaba el rendimiento de los animales en el LAM, así como una disminución de sinaptogénesis.

1.8 Reconsolidación en la memoria espacial.

Rossato y colaboradores (2006) mostraron que grupos independientes de ratas inyectadas con anisomicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) en la región CA1 del hipocampo, 24 ó 120 horas después del último ensayo del LAM o bien inmediatamente después de una sesión de evocación lograba afectar la reconsolidación de esta tarea. Sin embargo, los grupos sometidos a una sesión de reactivación 2 horas después del último ensayo, o al que durante la sesión de evocación la plataforma estuvo presente, no presentaron un déficit en este proceso.

De manera similar, Rodríguez-Ortiz y colaboradores (2007) reportaron que inyecciones de anisomicina entre las regiones CA3 y CA1 del hipocampo, 20 minutos antes de la sesión de reactivación y evaluada 7 días después, afecta la reconsolidación en los animales entrenados por 3 días, pero no en el grupo entrenado durante 5 días. Estos resultados sugieren que la reconsolidación ocurre inmediatamente después de una sesión de reactivación de la memoria (en ausencia de la plataforma) y sólo cuando el aprendizaje no ha llegado a un nivel

en el cual el animal ha aprendido lo suficiente de la tarea, como para seguir integrando más información a la memoria previamente consolidada, o a lo que se le denomina como *asíntota conductual*. Asimismo, Morris y colaboradores (2006) usaron un protocolo conductual que constaba de 6 días de entrenamiento, con 4 ensayos por día y con la plataforma en un lugar distinto. Observaron que las inyecciones de anisomicina en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la sesión de reactivación de la memoria, afectó el proceso de reconsolidación.

Por su parte, Torras-García y colaboradores (2005) usando una tarea de memoria espacial de discriminación de olores, reportaron que la inyección intraventricular de APV-DL (un antagonista de los receptores NMDA) después de una sesión de reactivación de la memoria, produce amnesia. Por lo que se concluyó, que los receptores NMDA están involucrados en el proceso de reconsolidación de la memoria espacial.

En resumen, estos trabajos muestran que la reconsolidación de la memoria espacial evaluada con el LAM en el hipocampo dorsal, es dependiente de la síntesis de proteínas, del número de ensayos que se hayan dado, de la ausencia o presencia de la plataforma durante la sesión de reactivación y de los receptores NMDA; además de que es un fenómeno independiente del tiempo transcurrido entre los días de entrenamiento y la sesión de evocación.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Planteamiento del problema.

El hipocampo es una estructura importante tanto para la evocación (Eichenbaum, 1997) como para la reconsolidación de la memoria (Rossato *et al.*, 2006). El proceso de reconsolidación es un mecanismo adaptativo y dinámico que permite renovar la plasticidad y modulación de la memoria. Los reportes anteriores indican que la función de los receptores NMDA se relaciona con un buen desempeño en el LAM y con el proceso de sinaptogénesis a causa de un nuevo aprendizaje, por lo que se propone que en la reconsolidación (aun cuando hay más elementos por integrar a la memoria tras una sesión de evocación) su función es importante. Mientras que la evocación de esta memoria depende en gran medida de la actividad del hipocampo dorsal. Así, en el presente trabajo se pretende evaluar el papel de los receptores NMDA (rNMDA) y GABA tipo A (rGABA_A) del hipocampo dorsal en el proceso de reconsolidación y evocación de la memoria espacial. En el caso de los rNMDA se evaluará su función antes e inmediatamente después de una sesión de evocación, mientras que para los rGABA_A lo será en la sesión de evocación.

2.2 Hipótesis.

La actividad sináptica derivada del hipocampo dorsal es determinante para que ocurra el proceso de evocación de la memoria espacial, de manera que si se activa la neurotransmisión GABAérgica en las subregiones CA1-CA3 del hipocampo durante una sesión de evocación, la memoria espacial previamente consolidada no podrá ser evocada, pero si reconsolidada.

Los reportes anteriores muestran que el proceso de evocación desencadena a la reconsolidación de la memoria espacial, siendo dependiente de la función derivada de los rNMDA, por lo que si se inhibe su actividad antes o inmediatamente después de una sesión de evocación en las subregiones hipocampales CA1 y CA3 entonces el proceso de reconsolidación de la memoria espacial se verá afectada a la baja.

2.3 Objetivo general.

Estudiar el papel que desempeña la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica (mediada por rNMDA) del hipocampo dorsal en la evocación y reconsolidación de la memoria espacial evaluada mediante el Laberinto Acuático de Morris (LAM).

2.4 Objetivos particulares

1.- Evaluar el efecto de la activación de los rGABA_A en el hipocampo dorsal mediante la administración de muscimol en una sesión de evocación del LAM.

2.- Estudiar el efecto de la inactivación de los rNMDA mediante la infusión de APV en el hipocampo dorsal en una sesión de evocación del LAM.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales.

Se usaron ratas Wistar macho obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con un peso promedio de 280 gramos. Cada una se mantuvo en una caja de plástico individual, con alimento y agua *ad libitum* en un cuarto con el fotoperiodo controlado (ciclo luz-oscuridad de 12-12 horas y temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.2 Procedimiento conductual.

3.2.1 Laberinto Acuático de Morris.

El Laberinto Acuático de Morris consta de una piscina circular (1.5m de diámetro y 1m de altura) llena de agua. La piscina se ubicó en un cuarto iluminado con cuatro lámparas; las claves espaciales eran los muebles y posters que se encontraban a mayor altura de la piscina. Dentro de la piscina se instaló una plataforma de 12×12 cm ubicada 1cm bajo la superficie del agua, la cual permaneció fija en el centro de uno de los cuatro cuadrantes. La temperatura del agua durante el entrenamiento, la evocación y la prueba se mantuvo en $21 \pm 3^\circ\text{C}$.

3.2.2 Protocolo

El procedimiento conductual se llevó a cabo entre las 11:00 y 15:00 horas. El entrenamiento consistió de siete ensayos por día, durante tres días. En cada ensayo, las ratas fueron puestas en lugares escogidos aleatoriamente dentro de la piscina. A los animales se les permitió nadar hasta que llegaran a la plataforma, o por un tiempo máximo de 60 segundos. En la plataforma permanecían 30 segundos. Después se colocaron en una caja de descanso por 30 segundos antes

del siguiente ensayo. Las ratas que en 60s no encontraban la plataforma, fueron guiadas hacia ésta y se siguió el mismo protocolo.

Tanto en la sesión de evocación, como el día de la prueba, las ratas nadaron libremente por 60 segundos en ausencia de la plataforma. Durante estos días la conducta fue monitoreada y grabada con un sistema de videocámara automático (San Diego instruments), conectada a una computadora personal equipada con el software que sirvió para medir la memoria en función de la latencia (tiempo transcurrido de la rata en arribar al sitio en donde se ubicaba la plataforma durante las sesiones de entrenamiento).

3.2.3 Cirugía y microinyección.

Empleando un aparato estereotáxico se realizó la implantación bilateral de dos cánulas guía de acero inoxidable de 23Ga y 9 mm de largo en hipocampo dorsal (coordenadas de Bregma: posterior -3.4 mm, lateral ± 1.7 mm, y ventral -2.7 mm; Paxinos y Watson, 1998). Los animales fueron previamente anestesiados por medio de una inyección intraperitoneal de ketamina (76 mg/kg) y xilazina (8 mg/kg). Se usó una fresa dental para perforar el cráneo e introducir las cánulas; éstas fueron fijadas con cemento dental y dos tornillos sujetos al cráneo. La herida de la cirugía craneal fue tratada con penicilina. Al finalizar la cirugía, los animales tuvieron 7 días de recuperación antes de iniciar el entrenamiento conductual. Para la microinyección bilateral se insertó un inyector en cada cánula guía, que se extendió 2 mm más allá de la cánula. Se usó una bomba automática de microinyección para difundir los fármacos.

3.2.4 Fármacos.

El muscimol se diluyó en una solución de NaOH 1M y posteriormente en salina fisiológica, quedando a una concentración final de 0.21 M.

El D,L-APV se diluyó en una solución de NaOH 1M y después en salina fisiológica quedando a una concentración final de 0.25 mM.

Los fármacos se inyectaron vía un tubo PE20 conectado a una microjeringa Hamilton, propulsada por una bomba de microinyección (Harvard Apparatus modelo 975), se inyectaron a una velocidad de 0.5µL/min por hemisferio y un minuto adicional permaneció el inyector en la cánula, para permitir la total difusión de los fármacos. Para la distribución de los grupos se procedió a dividir a la población de ratas de manera azarosa en dos grupos: el correspondiente a muscimol y APV. El grupo de muscimol se dividió en dos: grupo control y muscimol. El grupo APV se dividió en tres grupos: grupo control, el inyectado antes de la evocación e inmediatamente después de la evocación.

Así, el día de la evocación, la solución vehículo, mucimol y APV, fueron inyectados (en los respectivos grupos) 15 minutos antes de introducir a la rata a un ensayo sin plataforma. Y solo a un grupo de APV se le difundió el respectivo fármaco inmediatamente después de finalizar el ensayo.

3.2.5 Histología.

Al finalizar los procedimientos conductuales, se continuó a verificar el lugar de implante de las cánulas. Para ello, se realizó una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico, las ratas fueron sometidas a una perfusión transcardial con solución fisiológica (salina NaCl 0.9%). Los cerebros fueron removidos y fijados en una solución de paraformaldehído al 4%, se sumergieron y transfirieron a soluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30% (24 horas de exposición entre cada solución). Finalizado el tratamiento anticongelante -crioprotector- con sacarosa y con la ayuda de un micrótopo, se obtuvieron cortes de 40µm, que fueron montados en laminillas gelatinizadas para la posterior tinción con violeta de cresilo lo que permitió verificar el sitio de canulación usando un microscopio óptico (Nikon).

3.3 Análisis estadístico.

Se realizaron pruebas *t* de *Student* no pareadas para comparar el desempeño entre los grupos durante la adquisición del LAM, y para cada grupo con su tratamiento y sus respectivos controles. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$ para todos los análisis. Los datos son presentados como media \pm 1 ES.

IV. RESULTADOS

4.1 Histología.

La correcta implantación de las cánulas se evaluó mediante la extracción y el corte de los cerebros de las ratas operadas y su posterior tinción con violeta de cresilo (Tinción de Nissl). La histología mostró un canulaje en la subregión del hipocampo dorsal CA1-CA3 como se puede ver en la microfotografía representativa en la Figura 4. Estos resultados permitieron descartar a un total de cinco ratas del análisis estadístico, del total de 44 ratas.

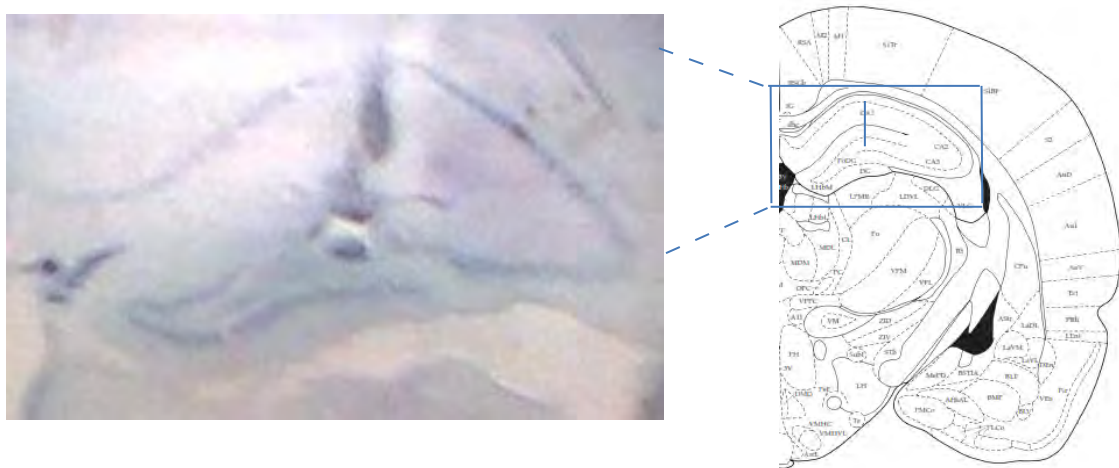


Figura 4. **A.** Fotomicrografía de sección coronal del sitio de canulaje en subregión del hipocampo dorsal CA1-CA3. Estos resultados fueron observados para el resto de los animales canulados sometidos al análisis estadístico; **B.** Diagrama coronal del sitio de canulaje en CA1-CA3 (Paxinos y Watson, 1998).

4.2 Adquisición de la tarea del Laberinto Acuático de Morris.

Con 7 ensayos por día, durante 3 días se llevó a cabo el entrenamiento en la tarea del Laberinto Acuático de Morris (LAM). Todos los animales mostraron un decremento en la latencia (tiempo en llegar a la plataforma) a lo largo de la adquisición de la tarea. En la figura 5, se puede observar la curva de aprendizaje con respecto a la latencia de cada ensayo a lo largo de los tres días de

entrenamiento, para cada grupo de ratas (muscimol, y APV). Durante los tres días, los grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, mostrando que los animales de cada uno de los grupos aprendieron el paradigma conductual del LAM de manera similar.

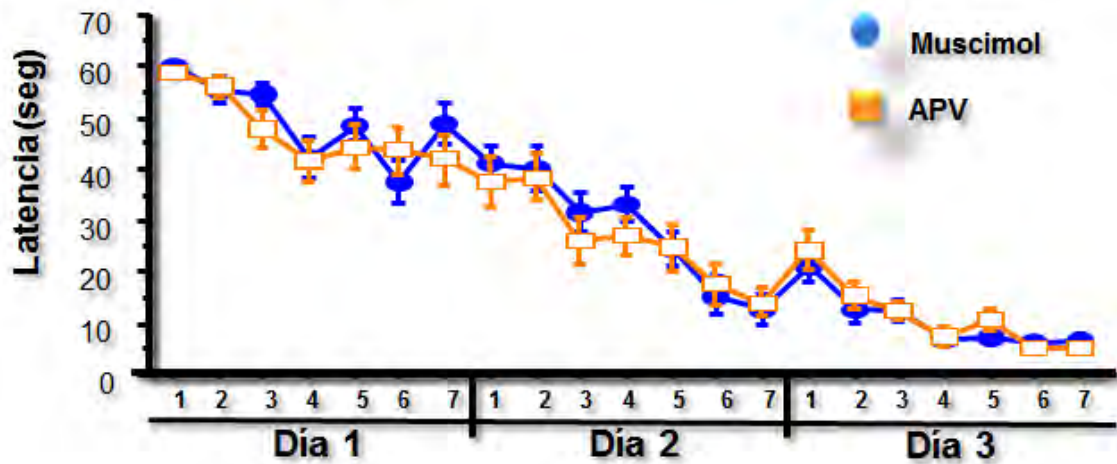


Figura 5. Adquisición. Latencia promedio \pm ES para cada ensayo del grupo de los grupos de Muscimol y APV.

4.3 rGABA_A en la evocación de la memoria espacial.

Se evaluó el papel de la actividad neuronal de las subregiones CA1-CA3 del hipocampo dorsal durante la evocación de la memoria del LAM mediante la difusión de muscimol, un agonista de los rGABA_A, 15 minutos antes de someter a las ratas a la sesión de evocación que tuvo lugar 24 horas después del último ensayo. Ese día, las ratas tratadas con muscimol, presentaron una latencia promedio significativamente mayor al grupo control como lo mostró la prueba t de student no pareada ($t_{(-29.17)} = -3.19, p < 0.05$), como se observa en la figura 6A. El día de la prueba, realizada 24 horas después a la sesión de evocación, el grupo inyectado con muscimol no mostró diferencias estadísticamente significativas con una prueba no pareada t de student ($t_{(-4.47)} = -0.74, p = 0.5$) en su latencia promedio (12 ± 6.17) respecto al control (7.53 ± 2.18).

Estos resultados muestran que la inactivación de las subregiones CA1-CA3 del hipocampo dorsal, por medio de la activación de los rGABA_A impide la expresión de la evocación de la memoria, sin afectar la memoria previamente consolidada o la reconsolidación de la memoria.

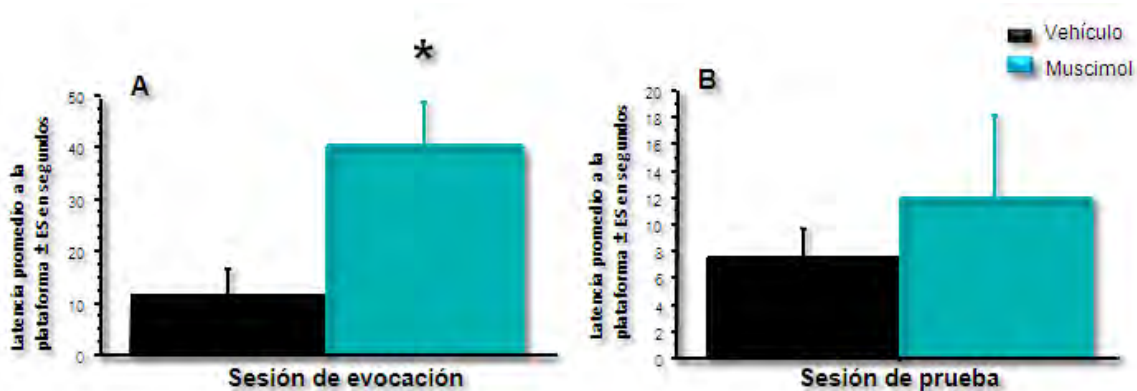


Figura 6. Efecto de muscimol en la subregión CA1-CA3 del hipocampo dorsal en la sesión de evocación y de prueba del LAM. **A.** Latencia promedio \pm ES a la ubicación de la plataforma en la sesión de evocación. **B.** Latencia promedio \pm ES a la ubicación de la plataforma en la sesión de prueba. * Denota diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

4.4 Participación de los rNMDA en la evocación de la memoria espacial.

Se evaluó la participación de los rNMDA en la subregión CA1-CA3 del hipocampo en la evocación de la memoria espacial. El antagonista de los rNMDA D,L-APV se difundió en el primer grupo 15 minutos antes (APVA) y en el segundo inmediatamente después de la sesión de evocación (APVD). El día de la sesión de evocación se observó que el grupo de ratas APVA presentó una latencia promedio (22.8 ± 15 segundos) significativamente mayor ($t_{(18.11)} = 2.32$, $p < 0.05$) en comparación con la latencia promedio del grupo APVD (4.7 ± 1 segundos) (Figura 7 A). La diferencia de latencias el día de la prueba entre estos grupos no fue significativa ($t_{(4.06)} = 1.1$, $p > 0.05$), ni comparados con el grupo control (APVA vs vehículo $t_{(2.32)} = 0.55$, $p > 0.05$; APVD vs Vehículo $t_{(-1.74)} = -0.67$, $p > 0.05$) (Figura 7 B).

Estos resultados sugieren que la inactivación de los rNMDA antes de la sesión de evocación de la memoria espacial afecta la expresión conductual, pero no la memoria previamente consolidada o la reconsolidación de la tarea. Sin embargo, el efecto no es significativo con respecto al control tanto el día de la inyección ($t_{(16.27)} = 1.58, p > 0.05$), como el día de la prueba ($t_{(2.32)} = 0.55, p > 0.05$).

El incremento en el número de animales ayudaría a disminuir el error observado en las gráficas, haciendo más homogéneos a los grupos (especialmente al de APVA). No obstante, para la elaboración de esta tesis fue imposible realizar estos cambios.

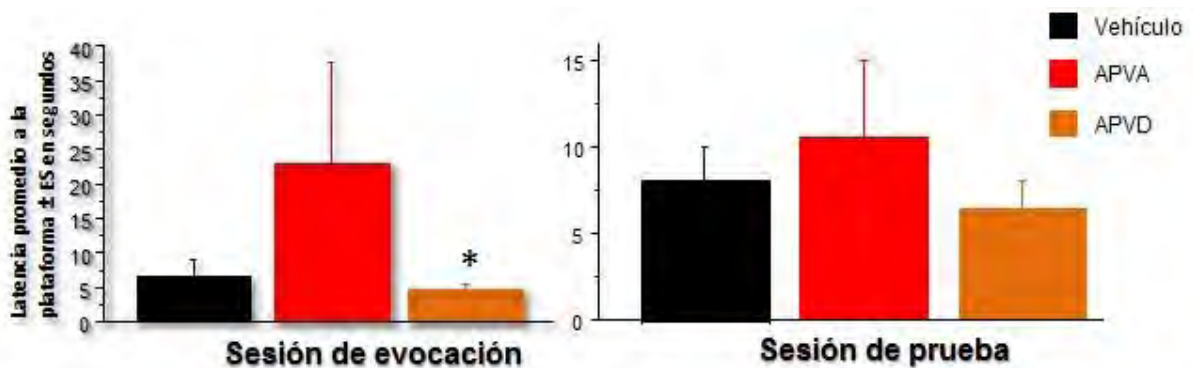


Figura 7. Latencia promedio \pm ES a la ubicación de la plataforma, **A.** En la sesión de evocación de la memoria y **B.** En la sesión de prueba. * Denota diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de ratas APVA con respecto al grupo APVD $P < .05$

V. DISCUSIÓN

5.1 Receptores Gabaérgicos del hipocampo dorsal en la evocación de la memoria espacial.

La evocación de la memoria espacial es un episodio espontáneo que supone la recuperación, organización y asociación del conocimiento (Nader *et al.*, 2000; Silvilotti y Nistri *et al.*, 1991) tanto relevante como irrelevante, a partir de la activación de redes neuronales intrínsecas interconectadas (Jo *et al.*, 2007), seleccionadas a partir de un estímulo extrínseco y la integración de diferentes recursos de información significativos en relación a un sitio (Sara, 2000).

En este trabajo se llevó a cabo la activación de los rGABA_A entre las subregiones CA1 y CA3 del hipocampo dorsal durante la evocación de la memoria espacial, usando el LAM como paradigma conductual, y muscimol como agonista de estos receptores. Observamos que la infusión bilateral de este agonista en la sesión de evocación provocó un incremento en la latencia, inhibiendo la evocación de la memoria espacial. Sin embargo, el día de la prueba no se observó un efecto de la droga sobre la memoria espacial. Esto indica que la activación de los rGABA_A inhibió la actividad neuronal, y por tanto la evocación de la memoria espacial, haciendo notar que la actividad sináptica derivada de estas subestructuras, es necesaria para permitir el proceso de evocación de esta memoria, pero no parecen participar en la estabilización de la misma, ya que no se afecta la reconsolidación.

Hirsh (1974 en Sara, 2000) ya había propuesto que el hipocampo es parte del sistema que media la evocación de la memoria contextual, ya que observó una relación entre la inactivación reversible en todo el hipocampo en relación a la falta de evocación de dicha memoria. Al respecto, hay reportes que indican que la actividad sináptica en el hipocampo dorsal es necesaria para la evocación de la memoria contextual. En tareas conductuales como el condicionamiento al miedo,

se ha observado que el hipocampo se vale de información contextual para eliminar ambigüedades sobre el estímulo condicionado, de manera que si se inhibe el hipocampo no se da la evocación de esta memoria (Hobin *et al.*, 2006). En inhibición latente, Amaral y colaboradores (2007) reportaron que la infusión de muscimol en el hipocampo dorsal afecta la evocación de esta memoria. Así, estos reportes y los resultados del presente trabajo sugieren que la inactivación de esta región del hipocampo afecta la evocación de la memoria espacial y/o contextual.

La gran cantidad de evidencia sobre la función del hipocampo y la evocación ha hecho notar que este proceso depende de que la memoria se mantenga activa (Silvotti y Nistri 1991) y a su vez, de que sea regulado (Nakazawa *et al.*, 2002), mediante mecanismos de inhibición sináptica, como los que desempeña la transmisión GABAérgica (Makkar *et al.*, 2010; Safiulina *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos, destacan que estos receptores inhiben el proceso de evocación, probablemente por que contribuyen a mantener las sinapsis en silencio (Safiulina *et al.*, 2009) con efectos a nivel neuronal tales como: la hiperpolarización (Davis *et al.*, 2000), o los cambios en la actividad metabólica (Sara, 2000). Con la presencia de muscimol, se produce un hipometabolismo que reduce la actividad sináptica (Maichrzak y Di Scala, 2000) y afecta el patrón de la actividad teta, un tipo de descargas que ocurren preferentemente en ratas entrenadas en un paradigma conductual. Por ejemplo, en la subregión CA1 el incremento en la actividad GABAérgica tiene efecto en la mayoría de las células piramidales e interneuronas sobre este patrón de disparo neuronal (Krebs-Kraft *et al.*, 2007).

Estructuralmente, la evocación de la memoria espacial del LAM es el resultado de la comunicación entre la corteza prefrontal y CA3, como lo reportaron Jo y colaboradores (2007), quienes observaron que la inhibición mediante la

activación de los rGABA_A en grupos distintos de ratas, unas en CA3 y otras en la corteza prefrontal se afectaba la evocación de la memoria espacial.

Asimismo, se ha visto que el sistema GABAérgico no sólo está implicado como lo muestran los presentes resultados y como se ha descrito anteriormente en la regulación del proceso de evocación en el hipocampo dorsal, sino que en la amígdala, en donde las células GABAérgicas se proyectan, regulan otras etapas de la memoria, como la adquisición (Safiulina *et al.*, 2009), la consolidación (Pain *et al.*, 2002; Tano *et al.*, 2009) y reconsolidación de la memoria al miedo (Makkar *et al.*, 2010).

Finalmente, Riedel y colaboradores (1999) demostraron que el hipocampo dorsal es indispensable para adquirir y evocar la memoria espacial. En particular observaron que la inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica mediada por los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) afecta la evocación de la memoria espacial. Mientras que en el presente trabajo se muestra que la actividad de los rGABA media la evocación de esta memoria.

5.2 Los receptores NMDA en la evocación de la memoria espacial.

El patrón de estimulación eléctrica en la formación hipocampal genera alteraciones sinápticas (Morris y Frey, 1997) que permiten cambios rápidos y persistentes necesarios en el proceso de la memoria y el aprendizaje. La activación de los rNMDA, un subtipo de receptores glutamatérgicos dependientes de voltaje y ligando, se encuentran distribuidos en el sistema nervioso de los mamíferos y en el hipocampo hay una alta densidad. La función de estos canales iónicos se relaciona con el desarrollo de fibras musgosas (Shapiro, 2001; y Morris y Frey, 1997), con la actividad de las células de lugar (Da Silva *et al.*, 2008); conductualmente con la reconsolidación de la memoria espacial en el laberinto radial (Przbylowski y Sara 1997) y adquisición del aprendizaje espacial (Morris y Frey, 1997).

En el presente trabajo, se evaluó el papel de los rNMDA en la reconsolidación y evocación de la memoria, así que 24 horas después del último ensayo se dio a los roedores una sesión de evocación tiempo en el cual la exploración espacial induce un proceso que notifica sobre lo que se percibe y lo que se conoce (Shapiro, 2001). Los resultados obtenidos aquí sugieren que la inhibición de los rNMDA del hipocampo dorsal no tienen efecto en el proceso de la reconsolidación pero si en la evocación de una memoria espacial. Sin embargo, para tener resultados significativos sobre el efecto en la reconsolidación y la evocación, es importante aumentar el número de muestra utilizado.

Se sabe que tanto la consolidación como la reconsolidación de la memoria son eventos que incluyen la síntesis de proteínas, activación de MAPcinasas, CREB, c-fos y zif268. Sin embargo, Tsien y colaboradores (1996) han sugerido que los rNMDA mantienen la memoria después de la consolidación, por medio del reforzamiento sináptico (Morris y Frey, 1997).

Brun y colaboradores (2002) observaron que la inactivación de los rNMDA en CA3, provocan un déficit en la capacidad de localizar el sitio de la plataforma. Sin embargo, este déficit no se observa, cuando hay un enriquecimiento de marcas espaciales en el ambiente de entrenamiento de los animales. Esto permitió concluir que el enriquecimiento contextual en el ambiente de entrenamiento hace menos susceptible a la memoria a desencadenar el proceso de reconsolidación tras una sesión de evocación. De manera similar, se observó que la inhibición de síntesis de ARN mensajero inmediatamente después de una sesión de evocación (sin plataforma), afecta el proceso de la reconsolidación de la memoria espacial (Da Silva *et al.*, 2008).

Además, Morris y colaboradores (2006) explican que la reconsolidación no es un proceso general o característico que se desencadene tras la evocación de la memoria. Nader y Oliver (2009) reportaron que la inducción de la reconsolidación depende de ciertas variables de naturaleza fisiológica, ambiental y situación

psicológica. Por su parte, Szu-Han y colaboradores (2009) encuentran que la memoria es menos susceptible a desencadenar el proceso de reconsolidación cuando el número de ensayos se incrementa, y por tanto a ser afectado por un agente amnésico.

Otro parámetro relacionado en el estudio de la reconsolidación es la duración de la sesión de evocación de la memoria (Lee *et al.*, 2006), es decir, mientras mayor es su duración, el fármaco empleado puede afectar la fase de extinción de la memoria, pero si en la sesión de evocación no se inicia la extinción, entonces el fármaco afecta la fase de reconsolidación (Dudai, 2006). En este sentido, los datos obtenidos en relación al estudio de la reconsolidación debe analizarse con precaución, tomando en cuenta las variables involucradas en una tarea conductual.

Al respecto, Gutiérrez y colaboradores (1999), reportaron que la sola inyección de solución vehículo en corteza insular afecta la evocación de la memoria espacial. En este sentido, se puede tomar como otro grupo control a las ratas del grupo APVD, ya que fue un grupo que realizó la sesión de evocación en ausencia de cualquier intervención en el hipocampo dorsal, permitiendo concluir que la actividad de los receptores NMDA del hipocampo dorsal es necesaria para la evocación de la memoria espacial pero no para su reconsolidación, como lo muestran los resultados en la sesión de prueba.

Si bien, lo anterior indica que la actividad de los rNMDA se relaciona con el proceso de evocación, Bast y colaboradores (2005) evidenciaron una diferencia funcional entre los receptores para glutamato, NMDA y los AMPA, en las etapas de la memoria espacial. Usando el paradigma de memoria aloctónica a un lugar, observaron que los rNMDA son necesarios para la adquisición de la memoria, mientras que los receptores AMPA regulan preferentemente la evocación. Notaron que la infusión de APV antes del siguiente ensayo, perteneciente a la adquisición de la memoria, evita la evocación de la memoria aloctónica a un lugar 20 minutos

después, tiempo en el que el fármaco aún está activo. Por otra parte, Davis y colaboradores (1992) observaron que la inhibición de los rNMDA con APV durante el entrenamiento permite la adquisición pero ésta ocurre lentamente, y explican que el aprendizaje aunque lento, ocurrió vía la neurotransmisión mediada por los receptores AMPA.

En conjunto, estos resultados dejan claro que los rNMDA son necesarios en los primeros ensayos del aprendizaje espacial aun cuando no se ha llegado a una asíntota conductual, pero si son inactivados, la adquisición puede ser mediada vía los receptores AMPA. De manera similar, aunque se ha observado que los receptores AMPA son necesarios para la evocación de la memoria espacial, el presente trabajo muestra que los rNMDA también participan en este proceso.

VI. CONCLUSIÓN

El hipocampo participa en varios procesos de la memoria espacial, como son la adquisición, la consolidación, la evocación y la reconsolidación (Bliss y Collingridge, 1993; Martin *et al.*, 2000). Los presentes resultados, derivados de la infusión de muscimol o APV en el hipocampo dorsal, dan conocimiento sobre la importancia de la actividad neuronal del hipocampo dorsal en la representación espacial y en consecuencia de la evocación conductual del LAM. Así la inhibición por medio de la activación de los rGABA_A o bien por la inhibición de los rNMDA afecta la evocación, pero no la reconsolidación de la memoria espacial.

VII. LITERATURA CITADA

Akirav I.M.M. 2006. Ventromedial Prefrontal Cortex is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory. *Cereb Cortex*. 16:1759-1765.

Amaral O.B., Luft T., Cammarota M., Izquierdo I. y Roesler R. 2007. Temporary Inactivation of the Dorsal Hippocampus Induces a Transient Impairment in Retrieval of Aversive Memory. *Behavioral Brain Research*. 180:113-118.

Andersen P., Soleng F. A., Raastad M. 2000. The Hippocampal Lamella Hypothesis Revisited. *Brain Research*. 886: 165-171.

Artinian J., McGauran T., Anne-Marie, De Jaeger X., Mouledous L., Frances B. y Roullet P. 2008 .Protein Degradation, as with Protein Synthesis, is Required During not only Long-Term Spatial Memory Consolidation but also Reconsolidation. *European Journal of Neuroscience*. 27:3009-3019.

Bast T., Da Silva M. B. Y Morris M. G. R. 2005. Distinct Contributions of Hippocampal NMDA and AMPA Receptor to Encoding and Retrieval of one-trial Place Memory. *The Journal of Neuroscience*. 25: 5845-5856

Bear M.F. y Connor B.W. 2001. *Neuroscience. Exploring the Brain*. 2da edición. Lippincott Williams y Wilkins. USA. pp 612.

Bennerman M.D., Yee K.B., Lemaire M., Wilbrecht L., Jarrad L., Iversen S.D., Rawslins P.N.J. y Good A.M. 2001. The Role of the Entorhinal Cortex in two forms of Spatial Learning and Memory. *Exp. Brain. Res*. 141:281-303.

Bliss T. V. P. y Collingridge G. L. 1993. A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Nature*. 361:31–39.

Bolding K. y Rudy W. J. 2006. Place Learning in the Morris Water Task: Making the Memory Stick. *Learning and Memory* 13:278-286.

Breen R.A., McGaugh J.L.1961. Facilitation of Maze Learning with Posttrial Injections of Picrotoxin. *Comp Physiol Psychol*. 54:498– 501.

Brun V.H., Otnass M.K., Molden S., Steddenach H.A., Witter M.P., Moser M.B. y Moser E.I. 2002. Place Cells and Place Recognition Maintained by Direct Entorhinal-Hippocampal Circuitry. *Science*. 296:2243-2246.

Da Silva C. W., Bonini S. J., Bevilaqua M. R. L., Medina H. J., Izquierdo I. y Cammarota M. 2008. Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory. *Hippocampus*. 18:29-39.

Davis H. P. y Square. 1984. Protein Synthesis and Memory: A Review. *Psychological Boletin* 96:518-559.

Davis M. A., Penschuck S., Jean-Marc F. y McCarthy M. M. 2000. Developmental Switch in the Expression of GABA_A Receptor Subunits α_1 y α_2 in the Hypothalamus and Limbic System of the Rat. *Developmental Brain Research*. 119:127-138.

Dudai Y. 2002. *Memory from A to Z. Keywords, Concepts and Beyond*. Oxford: Oxford University Press. pp. 6, 59, 210, 221.

Dudai Y. 2006. Reconsolidation: the Advantage of Being Refocused. *Current Opinion in Neurobiology*. 16:174-178.

Eichenbaum H., Mathewa P., Cohen N. J. 1989. Further Studies of hippocampal Representation During Odor Discrimination Learning. *Behavior Neuroscience*. 103:1207-1216.

Eichenbaum H. 1997. Declarative Memory: Insights from Cognitive Neurobiology. *Annual Review Psychology*. 48:547-572.

Ferbinteanu J. y McDonald A. J. 2000. Dorsal and Ventral Hippocampus: Same or Different? *Psychobiology*. 28:314-324.

Forcato C., Burgos L. V. y Argibay F. P. 2007. Reconsolidation of Declarative memory in humans. *Learning and Memory*. 14:295-303.

Forcato C., Argibay F. P., Pedreira E. M, Maldonado H. 2009. Human Reconsolidation does not always occur when a Memory is Retrieved: The Relevance of the Reminder Structure. *Neurobiology of Learning and Memory*. 91:50-57.

Frankland W. P. y Bontempi B. 2005. The Organization of Recent and Remote Memories. *Neuroscience*. 6:119-130.

Geinisman Y., Disterhoft F. J., Gundersen G. J. H., McEchron D. M., Persina S. I., Power M. J., Van Der Zee A. E. y West J. M. (2000). Remodeling of Hippocampal Synapses after Hippocampus-Dependent Associative Learning. *The Journal of Comparative Neurology*. 417:49-59.

Gong-Wu W. y Jing-Xia C. 2008. Reversible Disconnection of the Hippocampal-Prelimbic Cortical Circuit Impairs Spatial Learning but not Passive Avoidance Learning in Rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90: 365-373.

Gutierrez H. Hernandez-Echegaray E., Ramirez-Amaya V. y Rattoni-Bermudez F. 1999. Blockade of N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Insular Cortex Disrupt Taste Aversion and Spatial Memory Formation. *Neuroscience*. 89(3):751-758.

Hawkins D. R., Kandel R. E. y Bailey H.C. 2006. Molecular Mechanisms of Memory Storage in *Aplysia*. *Biol.Bull*. 210: 174-191.

Hobin A. J., Ji J. y Maren S. 2006. Ventral Hippocampal Muscimol Disrupts Context-Specific Fear Memory Retrieval After Extinction in Rats. *Hippocampus*. 16:174-182.

Izquierdo I. y Medina H. J. 1997. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and its Connection to Activity in other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. 68:285-316.

Jo, Y. S., Park, E. H., Kim, I. H., Park, S. K., Kim, H., Kim, H. T. et al .2007. The Medial Prefrontal Cortex is Involved in Spatial Memory Retrieval under Partial-Cue Conditions. *The Journal of Neuroscience*. 27:13567-13578.

Kandel R. E. 2001. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Genes and Synapses. *Science*. 294: 1030-1038.

Krebs-Kraft L. D., Wheeler G. M. y Parent B. M. 2007. The Memory-Impairing Effects of Septal GABA Receptor Activation Involve GABAergic Septo-Hippocampal Projection Neurons. *Learning and Memory*. 14:833-841.

Lechner A. H., Squire R. L. y Byrne H. J. 1999. 100 Years of Consolidation-Remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*. 6:77-87.

Lee I., Yoganarasimha D., Rao Geeta y Knierim J. J. 2004. Comparison of Population Coherence of Place Cells in Hippocampal Subfields CA1 and CA3. *Nature*. 430:456-459.

Lee C. L. J., Milton L. M. y Everitt J. B. 2006. Reconsolidation and Extinction of Fear Conditioned: Inhibition and Potentiation. *The Journal Neuroscience*. 26(39): 10051-10056.

Lee. C. L. J. 2008. Memory Reconsolidation Mediates the Strengthening of Memories by Additional Learning. *Nature Neuroscience*. 11:1264-1266.

Lee C. L. J., Everitt J. B., Thomas J. K. 2004. Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science*. 304:839-843.

Leutgeb S., Leutgeb K. J., Treves A., Moser M. B. y Mosser I. E. 2004. Distinct Ensemble Codes in Hippocampal Areas CA3 y CA1. *Science*. 305: 1295-1298.

Majchrzak M. y Di Scala G. 2000. GABA and Muscimol as Reversible Inactivation Tools in Learning Memory. *Neural Plasticity*. 7:19-29.

Makkar R. S., Zhang Q. S. y Cranney J. 2010. Behavioral and Neural Analysis of GABA in the Acquisition Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Fear Memory. 35:1625-1652.

Martin S. J., Grimwood P. D. y Morris R. G. 2000. Synaptic Plasticity and Memory: an Evaluation of the Hypothesis. *Review Neuroscience*. 23:649–711.

Meiri N. y Roseblum K. 1998. Lateral Ventricle Injection of the Protein Synthesis Inhibitor Anisomycin Impairs Long-Term Memory in a Spatial Memory Task. *Brain Research*. 789:48-55.

Mesulam M.M. 1998. From Sensation to Cognition. *Brain*. 121:1013-1052.

Misanin J.R., Miller R.R. y Lewis D. J. 1968. Retrograde Amnesia Produced by Electroconvulsive Shock After Reactivation of a Consolidated Memory Trace. *Science*. 160:554-555.

Morris R. G., Anderson E., Lynch G.S. y Baudry M. 1986. Selective Impairment of Learning and Blockade of Long-Term Potentiation by an N-Metil-D-aspartate Receptor Antagonist, APV. *Nature*. 319:77-776.

Morris M. G. R. y Frey U. 1997. Hippocampal Synaptic Plasticity: Role in Spatial Learning or the automatic recording of attended experiences? *The Royal Society*, 352:1489-1503.

Morris M. G. R., Moser I. E., Riedel G., Martin S. J, Sandin J., Day M. y O'Carroll C. 2003. Elements of Neurobiological Theory of the Hippocampus: The Role of Activity-Dependent Synaptic Plasticity in Memory. *Philosophical Transactions The Royal Society*. 358:773-786.

Morris M. G. R. 2006. Elements of Neurobiological Theory of Hippocampal Function: the Role of Synaptic Plasticity, Synaptic Tagging and Schemas. *European Journal of Neuroscience*. 23:2829-2846.

Morris G.M.R., Inglis J., Ainge A. J., Olverman J. H., Tulloch J., Dudai Y. y Kelly A.T. P. 2006. Memory Reconsolidation: Sensitivity of Spatial Memory to Inhibition of Protein Synthesis in Dorsal Hippocampus During Encoding and Retrieval. *Neuron*. 50:479-489.

Moser May-Britt y Moser I. E. 1998. Distributed Encoding and Retrieval of Spatial Memory in the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 18(18):7535-7542.

Moser M.B. Tollesdrud A., Moser E.I. y Andersen P. 1997. Multiple Substrate for Spatial Learning in the Rat Hippocampus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:621.

Moser E. I., Krobert K. A., Moser M. B. y Morris R. G. M. 1998. Impaired Spatial Learning After Saturation of Long-Term Potentiation. *Science*. 281:2038-2042.

Nader K y Hardt Oliver. 2009. A Single Standard for Memory: The Case for Reconsolidation. 10:224-234.

Nader K., Schafe E. G. y Le Doux E. J. 2000. Fear Memories Require Protein Synthesis in the Amígdala for Reconsolidation After Retrieval. *Nature*. 406:722-726.

Nakazawa K., Quirk C. M., Chitwood A. R., Watanabe M., Yeckel F. M., Sun D. L., Katp A., Carr A. C., Johnston D., Wilson A. M. y Tonegawa S. 2002. Requirement for Hippocampal CA3 NMDA Receptor in Associative Memory Recall. *Science*. 297(5579):211-218.

O'Keefe J. y Nadel N. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Oxford University Press.

Pain L, Launoy A., Fouquet N. y Oberling P. 2002. Mechanisms of action of Midazolam on Expression of Contextual Fear in Rats. *Brain Journal Anaesthesia*. 89:614-621.

Paxinos G. and Watson C. (1998) *The rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.

Pedreira E. M., Pérez-Cuesta M. L. y Maldonado H. 2004. Mismatch Between what is Expected and what Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. *Learning and Memory*. 11:579-585.

Prado. A.R.A y Quirarte L.G. 2007. La Consolidación de la Memoria, un siglo después. *Revista de Neurología*. 45(5):284-292.

Przybylski J. y Sara S.J. 1997. Reconsolidation of Memory its Reactivation. *Behavior Brain Research*. 84:241-246.

Puelles L.L., Martínez P.M. y Martínez M. 2008. *Neuroanatomía*. Editorial Médica Panamericana, Madrid. pp 388.

Purves D. *et al.*, 2004. *Neurosciences*. 3era Edición. Sinauer Associates, Massachusetts.USA.

Ramírez-Amaya V., Balderas I., Sandoval J., Escobar L. M. y Bermúdez-Rattoni F. 2001. Spatial Long-Term Memory is Related to Mossy Fiber Synaptogenesis. *The Journal Neuroscience*. 21:7340-7348.

Riedel G., Micheau J., Lam M. G.A., Roloff L. V. E., Martin J. S., Bridge H., De Hoz L., Póeschel B., McCulloch J. y Morris M. G. R. 1999. Reversible Neural Inactivation Reveals Hippocampal Participation in Several Memory Processes. *Nature Neuroscience*. 10:898-905.

Rodríguez-Ortiz C. J., García-De la Torre P., Benavides E., Ballesteros M.A., Bermudez-Rattoni F. 2008. Intrahippocampal Anisomycin Infusions Disrupt

Previously Consolidate Spatial Memory only when Memory is Update. *Neurobiology of Learning and Memory*. 89:352-359.

Rosenzweig R. M. y Bennet L. E. 1972. Cerebral Changes in Rats Exposed Individually to an Enriched Environment. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 80:304-313.

Rossato I. J, Bevilaqua M.R. L, Medina H. J. Izquierdo I. y Cammarota M. 2006. Retrieval Induces Hippocampal-Dependent Reconsolidation of Spatial Memory. *Learning and Memory*. 13:431-440.

Routtenberg A. y Rekart J. L. 2005. Post-translational Protein Modification as the Substrate for Long-Lasting Memory. *Trends Neurosciences* January. 28(1):12-9.

Safiulina F. V. y Cherubini E. 2009. At Immature Mossy Fibers-CA3 Connections, Activation of Presynaptic GABA_B Receptor by Endogenously Released GABA Contributes to Synapses Silencing. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 3:1-10.

Sara J. S. 2000. Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learning and Memory*. 7:73-84.

Sarnat B.H., Martin G. y Netsky A.B. 1976. *Evolution of the Nervous System*. New York. Oxford University Press.

Shapiro Matthew, PhD. 2001. Plasticity, Hippocampal Place Cells, and Cognitive Maps. *Arch Neurol*. 58(6):874-881.

Silvilotti L. y Nistri A. 1991. GABA Receptors Mechanism in the Central Nervous System. *Progress in Neurobiology*. 36:35-92.

Suzuki A., Josselyn A. S., Frankland W. P., Masushige S., Silva J. Al. y Kida S. 2004. Memory Reconsolidation and Extinction have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *The Journal of Neuroscience*. 24(20):4787- 4795.

Szu-Han W. y Morris M.G.R. 2009. Hippocampal-Neocortical Interactions in Memory Formation, Consolidation, and Reconsolidation. *Annual Review of Psychology*. 61:49-79.

Tano C. M., Molina A. V., Maldonado H. y Pedreira E. M. 2009. Memory Consolidation and Reconsolidation in an Invertebrate Model: The Role of the GABAergic System. *Neuroscience*. 158:387-401.

Thompson F. R. 2000. *The Brain. A Neuroscience Primer*. Worth publishers, Tercera edición. 552 pp.

Torras-Garcia, Lelong J., Tronel S. y Sara J. S. 2005. Reconsolidation After Remembering an Odor-Reward Association Requires NMDA Receptors. *Learning and Memory*. 12:18-22.

Tsien J.Z., Huerta P.T. y Tonegawa S. 1996. The Essential Role of Hippocampal CA1 NMDA Receptor-Dependent Plasticity in Spatial Memory. *Cell*. 87:1327-1338.

Tulving E. 1972. Episodic and Semantic Memory. In E. Tulving y W. Donaldson. *Organization and Memory*. New York Academic Press. pp. 382-404.

Vicens P. Redolat R. y Carrasco C.M. 2003. Aprendizaje Espacial y Laberinto de Agua: Metodología y Aplicaciones. *Psicothema*. 15:539-544.

Wang Szu-Han y Morris M. G. R. 2010. Hippocampal-Neocortical Interactions in Memory Formation, Consolidation, and Reconsolidation. *Annual Review of Psychology*. 61:49-79.