



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto del entrenamiento prolongado y de la actividad dopaminérgica, en la memoria espacial a largo plazo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Mónica del Carmen Castro Cruz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Federico Bermúdez Rattoni
Instituto de Fisiología Celular

COMITÉ TUTOR

Dra. Goar Gevorgyan Markosian
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez
Instituto de Fisiología Celular

MÉXICO, D. F. Junio 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.

Cuando la memoria desaparezca
¿Qué serás?

A Hugo,

*A lado del ser amado
encontramos la plenitud de vivir,
sigamos caminando,
construyendo y viviendo
nuestras propias memorias.*

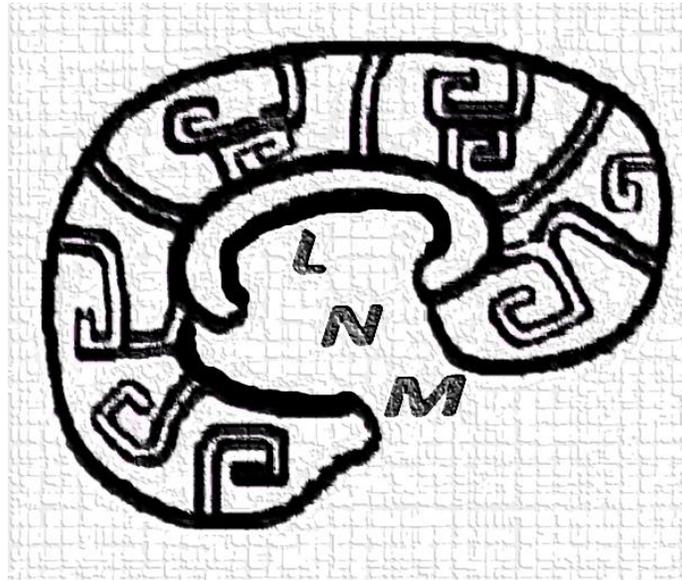
A mis padres y hermanos,

*Porque los cimientos
son la parte más importante
de ser humano.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México; con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 155242 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) PAPIIT -IN209413.

Con la beca CONACyT para maestría en la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, CV único 41 93 76.



Agradezco el apoyo constante e invaluable en el laboratorio, del Sr. Oreste Carbajal. Y a las técnicas académicas Dra. Israela Balderas y QFB. Perla Moreno.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por dejarme ser parte de sus filas y por seguir dándome las herramientas para formarme de manera integral.

Agradezco al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por la tutoría y por los valiosos consejos durante mi proceso de aprendizaje, lo que ha contribuido con mi desarrollo profesional y académico.

A la Dra. Goar Gevorgyan y al Dr. Iván Velasco Velázquez, por la asesoría en los exámenes tutorales por las facilidades técnicas para realizar el presente trabajo, como parte de mi comité tutor.

A los miembros del jurado para la obtención de grado por la lectura del presente trabajo y por los comentarios que ayudaron a enriquecerlo: Dra. Rocío Salceda, Dra. Angélica Zepeda, Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dr. Rudolf Buijs y Dra. Robyn E. Hudson.

A la Dra. Kioko Guzmán y al M. en C. Daniel Osorio, por el apoyo académico y personal que me han brindado gracias por las charlas científicas y personales.

A Jorge Escajadillo, con quien pude hacer un gran equipo de trabajo y de quien tuve la oportunidad de aprender muchas cosas.

A mis compañeros de laboratorio, quienes me han ayudado con sus críticas constructivas durante mi formación académica y por los buenos momentos en el laboratorio y fuera de él: Aketzali, Carla, Fernando, Chelo y aunque fue un solo semestre, a Lorelei y Aura.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
MARCO TEÓRICO	
Memoria y aprendizaje: conceptos y clasificación.....	9
Memoria episódica: ubicación espacial de un evento determinado.....	12
ANTECEDENTES	
Deterioro cognitivo en animales de edad avanzada.....	17
Incremento de las capacidades cognitivas: conducta.	
Sobre entrenamiento y ambientes complejos.....	20
Incremento de las capacidades cognitivas: farmacología.	
El sistema dopaminérgico: dopamina y receptores.....	23
Importancia del sistema dopaminérgico en la memoria y	
en la plasticidad sináptica.....	25
Mantenimiento de la memoria a largo plazo y mejoras conductuales, producidas a	
través del sistema dopaminérgico.....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	30
Objetivos particulares.....	30
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
Modelo Animal.....	31
Laberinto Acuático.....	32
Entrenamiento con LA y administración de fármaco.....	34
Análisis de datos.....	35

RESULTADOS

Efecto de la administración de un agonista D1 en el entrenamiento con LA, en ratones de edad avanzada.....	36
Efecto de la administración de un agonista D1 en el almacenamiento de la memoria a largo plazo, en ratones de edad avanzada.....	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS.....	49

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés).
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro (por sus siglas en inglés).
DA	Dopamina.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
D1	Receptores dopaminérgicos del tipo 1.
D2	Receptores dopaminérgicos del tipo 2.
EC	Entrenamiento corto.
EP	Entrenamiento prolongado.
pERK	Cinasa regulada por señales extracelulares (por sus siglas en inglés).
GPCR's	Receptores acoplados a proteínas G (por sus siglas en inglés).
i.p.	Intraperitoneal.
LTP	Potenciación a largo plazo (por sus siglas en inglés).
MCP	Memoria de corto plazo.
MLP	Memoria de largo plazo.
LA	Laberinto acuático.
NGF	Factor de crecimiento neuronal (por sus siglas en inglés).
NT-3	Neurotrofina 3.
PSD-95	Proteína de densidad post sináptica 95.
RO	Reconocimiento de objetos.
SKF	Fármaco (\pm)-SKF-38393 (Sigma Aldrich).
SYP	Sinaptofisina.
SL	Stratum lucidum.
SO	Stratum oriens.
9m	Nueve meses de edad.
4m	Cuatro meses de edad.

RESUMEN

El aprendizaje y la memoria son dos procesos intrincados y de gran importancia evolutiva para los animales. Existen diversos factores que contribuyen al déficit cognitivo en una gran gama de animales como el ratón, rata, humanos, entre otros. Entre los factores más destacados se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, los accidentes vasculares y el *proceso de envejecimiento*. Existen evidencias que muestran el efecto protector de la sobre estimulación con ambiente enriquecido (en animales jóvenes y viejos) y del sobre entrenamiento con Laberinto Acuático de Morris (en animales jóvenes). Dado el déficit cognitivo derivado del proceso de envejecimiento, nos dimos a la tarea de analizar si la cognición podía mejorar en ratones de edad avanzada (9 meses) con respecto a animales jóvenes (4 meses). Para ello desarrollamos dos protocolos de entrenamiento: un entrenamiento corto (de 4 días) y otro prolongado (de 9 días); evaluando la memoria de largo plazo 5 días después del entrenamiento. Al analizar los resultados encontramos que el entrenamiento prolongado produce una *asíntota de aprendizaje* a partir del 5° día de entrenamiento, a pesar de la diferencia de edad, lo cual indica que los animales tanto jóvenes como viejos, son capaces de aprender la tarea. Sin embargo, se pudo observar que el entrenamiento prolongado no aumenta la memoria de largo plazo en animales de edad avanzada como lo hace en animales jóvenes, lo cual nos indica una limitante por el factor edad por la que los animales, a pesar de recibir un entrenamiento, no mejoran su ejecución durante la memoria a largo plazo. El papel de la dopamina como neuromodulador en el sistema nervioso es de gran relevancia, ya que participa en la regulación de procesos plásticos como el L-LTP y en procesos de mantenimiento de la memoria a largo plazo. Por ello, decidimos aplicar un agonista dopaminérgico de los receptores D1/D5 durante ambos protocolos de entrenamiento. Los resultados obtenidos nos indican que, aunado a la estimulación repetida del sistema dopaminérgico por medio de la aplicación de SKF38393, el sobre entrenamiento contribuye la mejora en la ejecución de la memoria espacial a largo plazo, lo que interpretamos como un aumento en la consolidación de dicha memoria. De esa manera, los animales adultos maduros, se acercaron al desempeño de los animales jóvenes. Por otro lado, la estimulación conductual o dopaminérgica por separado, no nos muestran un efecto contundente de manera separada. De tal manera concluimos que la mejora conductual se debe al efecto sinérgico del sobre entrenamiento y de la estimulación dopaminérgica.

ABSTRACT

Learning and memory are two highly related processes with great evolutionary importance. Certain factors, such as aging are related to cognitive impairment in animals like mice, rats and humans. It has been demonstrated that environmental enrichment can induce an enhancing effect in learning in both young and old animals.

The same effect has been demonstrated by overtraining or by stimulation of dopaminergic activity with DA agonists in young animals. Given the cognitive impairment in middle aged and old animals, we hypothesized that we can improve memory consolidation in middle aged animals by overtraining and simultaneously dopaminergic system stimulation. Male CD1 mice were trained in short (ST) or prolonged (PT) Morris water maze training protocols (4 and 9 days respectively). In addition, middle aged group also received intraperitoneal injections of either SKF38393 (6mg/kg) (a selective D1/D5 agonist) or saline immediately after each training sessions with ST or PT. Long-term memory testing was performed 5 days after the last training session. Both groups of animals, 9 and 4 months of age, arrive to a learning asymptote on day 5 of training with the PT, showing that both groups of animals, young and middle aged learn the task. When tested for long-term memory, the over trained middle aged animals have a considerable improvement in LTM in relation with young animals, however, they still showed impaired performance compared with the younger ones. With the administration of D1/D5 agonist, after each training session in both training protocols, we found significant differences in long-term memory consolidation induced by the activity of prolonged training in addition to the dopaminergic system stimulation.

In conclusion all these experiments suggest that the effect of overtraining shows a synergy with the dopaminergic stimulation, improving the long-term memory consolidation in middle aged animals.

MARCO TEÓRICO

Memoria y aprendizaje: conceptos y clasificación.

Los animales se adaptan al medio con gran facilidad, lo cual les permite sobrevivir y evolucionar, dejando descendencia que garantice la supervivencia de la especie. Dicha facilidad de adaptación puede modularse, en parte, por medio de dos procesos ampliamente ligados: el *aprendizaje* y la *memoria* (Thompson, 2000). El aprendizaje es el proceso mediante el cual se adquiere y codifica la información del entorno por medio de los sentidos y precede al proceso de memoria, que es la capacidad para almacenar y expresar la información previamente adquirida (Thompson, 2000; Squire, 1987; Siegel *et al.*, 2006).

La clasificación de la memoria se realiza de acuerdo a variables como el tiempo o las estructuras de las que depende para consolidarse, por esa razón, la memoria se ha clasificado de acuerdo a diversos métodos como tareas conductuales y ablación de estructuras. Una de las clasificaciones más utilizadas es por su duración, dividiéndose así en memoria de corta duración, que va de minutos a horas (*memoria de corto plazo, MCP*) y memoria de duración más prolongada, que va de días, meses y hasta años (*memoria de largo plazo, MLP*) (Fig. 1) (Anderson, 1995; McGaugh, 2000). La MLP se caracteriza por un proceso denominado consolidación, término definido por Muller y Pilzecker desde 1900 (*Konsolidierung*), y que es el proceso mediante el cual se estabiliza progresivamente la memoria (Dudai, 2004). Cada tipo de memoria se puede representar molecularmente, de esa manera la MCP involucra la modificación de proteínas pre-existentes (fosforilaciones por cinasas persistentes y activación de canales de Ca^{2+}); mientras que la MLP se caracteriza por la activación de cascadas de segundos mensajeros que pueden llegar al núcleo, activar factores de transcripción y así, desencadenar la síntesis de proteínas *de novo* (Fig.2) (Dudai, 2004).

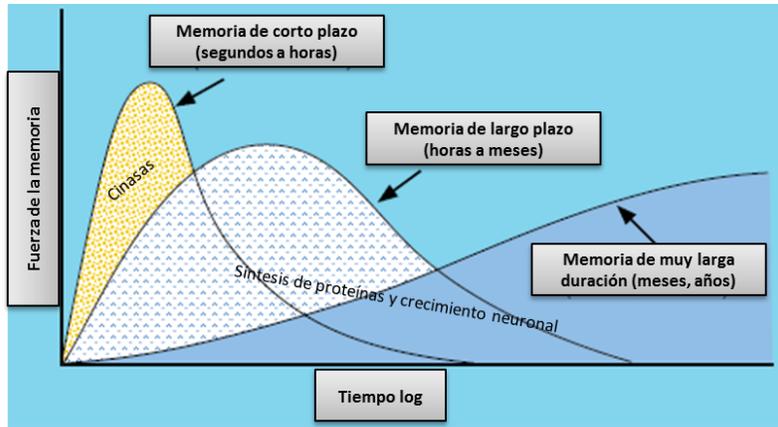


Fig. 1 Esquemática de las fases de la memoria. Las tres curvas que se muestran se entrecruzan mostrando un mecanismo intrincado. Descrito de izquierda a derecha: para la memoria de corto plazo, la más inmediata (de segundos a horas) sólo se requiere la activación de canales y de cinasas que contribuyan a llevar el mensaje río abajo. Finalmente se llega a la síntesis de proteínas y a la modificación estructural de la neurona, que permite el establecimiento de la memoria a largo y muy largo plazo (Modificado de McGaugh, 2000).

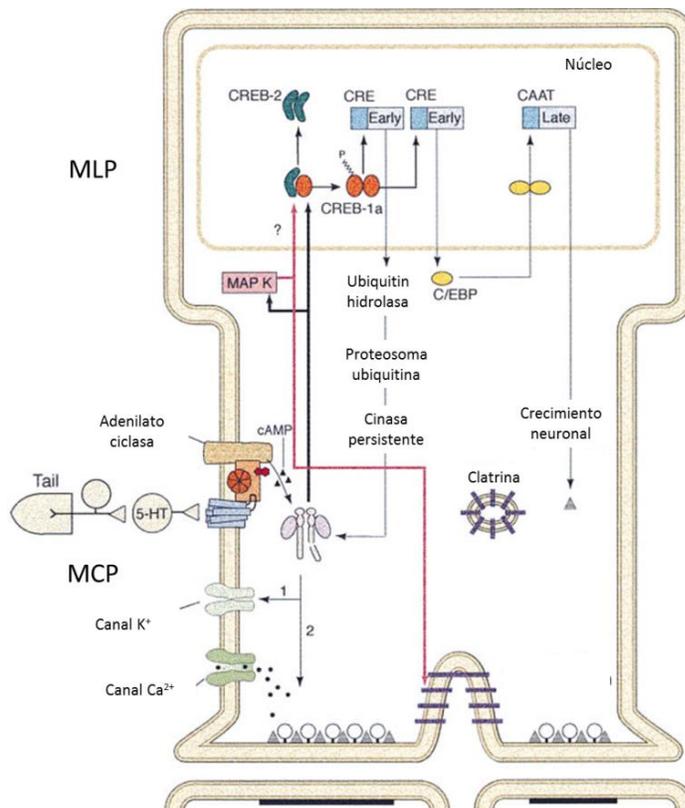


Fig. 2 Representación esquemática de los cambios moleculares que ocurren durante la memoria de corto plazo (MCP) parte inferior de la imagen, en donde se muestran canales de Ca^{2+} y K^+ (1 y 2), que implican modificaciones covalentes a proteínas preexistentes; mientras que en la parte superior de la imagen se muestran las modificaciones que participan en la formación de la memoria de largo plazo (MLP), como la activación de la proteína adenilato ciclasa y de segundos mensajeros que activan genes para promover el crecimiento y modificación axonal (Modificado de Milner *et al.*, 1998).

La MLP se ha dividido a su vez, en dos tipos: *memoria declarativa o explícita* y *memoria no declarativa o implícita* (Fig. 3). La memoria declarativa o explícita es aquella que implica el recuerdo de hechos y eventos (saber *qué*, *cuándo* y *dónde*, también llamada memoria episódica), mientras que la memoria no declarativa es aquella que se refiere a las habilidades que se poseen (“cómo hacerlo”), por ejemplo el aprendizaje perceptual, condicionamiento clásico y aprendizaje no asociativo (Milner *et al.*, 1998). Cada tipo de memoria de largo plazo, implica la participación activa de ciertas zonas cerebrales durante su formación y almacenamiento. Gracias a las metodologías ablativas, por ejemplo, con el tratamiento de focos epilépticos o investigando algunos accidentes que comprometen ciertas áreas cerebrales, se ha podido establecer qué estructuras del lóbulo temporal se relacionan en mayor medida con la formación y almacenamiento de memorias explícitas, particularmente aquellas que asocian información visual, espacial y temporal, como el hipocampo, la corteza entorrinal y la corteza perirrinal. Aunado a ello se han identificado aquellas estructuras relacionadas con memorias implícitas, como el cuerpo estriado, la amígdala o el cerebelo (Carrillo Mora, 2010; Carrillo Mora, 2010b; Milner *et al.*, 1998).

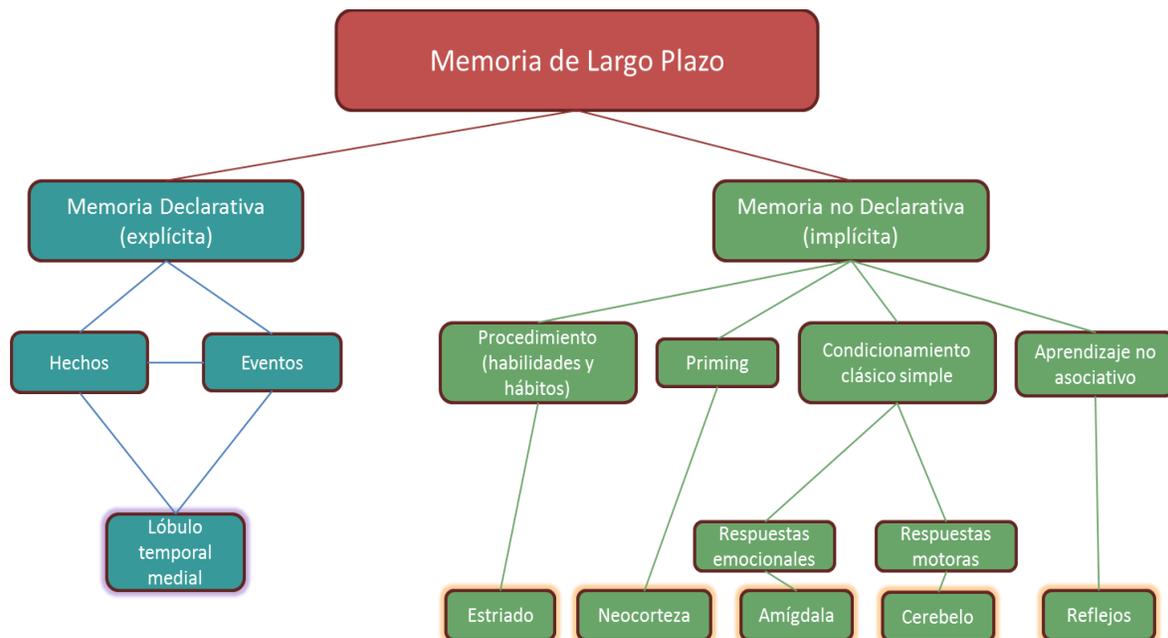


Fig. 3 Diagrama que muestra una clasificación de los sistemas de memoria en mamíferos, con las estructuras que participan en la formación de cada tipo de memoria (Modificado de Milner *et al.*, 1998).

Memoria episódica: ubicación espacial de un evento determinado.

La memoria episódica, como se mencionó anteriormente, corresponde a un tipo de MLP en la que se codifica información de tipo espacial/contextual, lo que nos permite determinar en dónde ocurre un evento determinado, de acuerdo a la experiencia previa (Milner *et al.*, 1998; Carrillo-Mora, 2010). De esa manera, la memoria espacial requiere la capacidad de adquirir y retener características del ambiente como: *rutas, configuraciones y localizaciones espaciales* para asociarlas a un evento concreto. Por lo tanto, este tipo de memoria es de gran importancia para la supervivencia de los animales, por ejemplo, para encontrar el camino de vuelta al nido, asociar un lugar a un depredador o para localizar un alimento guardado previamente (Vicens *et al.*, 2003).

El componente espacial/contextual de la memoria episódica hace uso de la navegación espacial, que es una conducta compleja caracterizada por la búsqueda de un lugar en el entorno, por medio de movimientos auto controlados en un espacio determinado. Los roedores pueden navegar de cuatro distintas formas durante la resolución de tareas conductuales: 1) orientación, 2) guía, 3) cartográfica y 4) integración de la ruta (Vicens *et al.*, 2003). 1) En la forma de orientación los animales basan su búsqueda en movimientos aprendidos durante la ejecución de la tarea conductual; 2) en la forma de guía los animales aprenden asociaciones entre estímulos señales y la meta; 3) La forma cartográfica implica el uso de señales distales con las que los animales se forman una representación de su entorno en algo llamado “mapa cognitivo”, mediante el cual localizan la meta; 4) finalmente la forma de integración de la ruta, consiste en un proceso de cambio de la información cuando las pistas ambientales no ofrecen la suficiente para llegar a la meta. Este cambio de información se da mediante un sistema interno de referencia basado en el lugar de salida antes de iniciar la navegación y búsqueda de la meta, por lo que el animal usa claves basadas en la cinestesia y señales vestibulares (Santín *et al.*, 2000).

Para estudiar los procesos implicados en la memoria espacial en condiciones de laboratorio, se han desarrollado diversas tareas o laberintos, usados para evaluar la memoria espacial en primates (incluyendo el humano), roedores (ratas y ratones) e insectos (como *Drosophila sp*). Uno de los modelos más utilizados en roedores, es el laberinto acuático de Morris (LAM), también llamado *laberinto de agua* o simplemente *laberinto acuático* (LA).

El LA es una tarea conductual desarrollada por Richard Morris en 1984, en la cual los animales se ven expuestos a nadar varios días en un tanque con agua, para encontrar una plataforma oculta (*plataforma no visible*) apoyados en claves espaciales que se encuentran alrededor del laberinto (Fig 4A). Esta tarea conductual requiere de pocos días de entrenamiento, a lo largo de los cuales se observa una reducción en el tiempo de nado para llegar a la plataforma (*latencia*) (Fig. 4B,C,D). Finalmente, ya sea 90 minutos (MCP) o 24hrs en adelante (MLP), se mide la memoria la memoria espacial en ausencia de la plataforma (Fig. 4E), en donde finalmente se evalúa la consolidación de la ubicación de la plataforma (Morris, 1984).

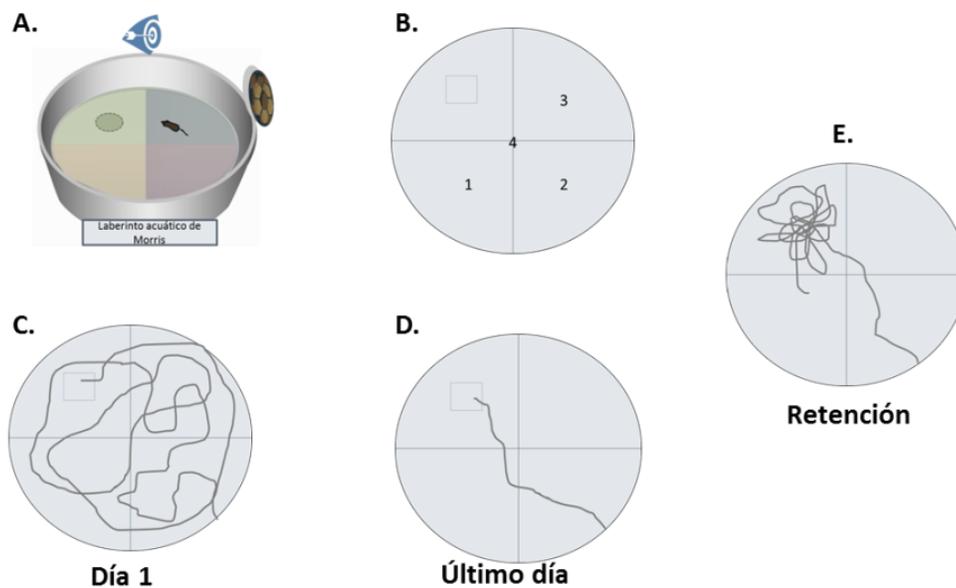


Fig. 4 Representación esquemática del Laberinto acuático (LA). En A. se observa el tanque con agua y una plataforma oculta por debajo del agua, el tanque se divide en cuadrantes, desde los cuales el animal es entrenado para ubicar la plataforma guiado por claves espaciales que rodean el tanque; en B. se muestra la división del tanque en 4 cuadrantes; en C. se puede ver el movimiento errático del animal el primer día de entrenamiento, durante el cual puede o no llegar a la plataforma; sin embargo el número de entrenamientos produce una reducción de la latencia en el último día, mostrado en D. Finalmente en E. se muestra el patrón de movimientos del animal el día de la prueba de memoria a largo plazo, en donde pasa mayor tiempo en el lugar en donde se encontraba la plataforma.

El LA tiene otras ventajas ya que evita que los animales utilicen claves no espaciales como el olor para resolver la tarea. Esta tarea permite evaluar la memoria espacial de referencia, si la plataforma permanece en el mismo lugar durante los ensayos; así como la memoria de trabajo si la plataforma se cambia de posición en cada ensayo. De tal manera que la memoria de referencia es independiente de los ensayos y permite aprender la ubicación de la plataforma de escape. En cambio la memoria de trabajo es temporal y depende de cada ensayo llevado a cabo, lo que le permite al animal variar su metodología de resolución. Sin embargo, una de las desventajas es que la inmersión en el agua puede aumentar el nivel de estrés de los animales, agregando una variable importante a considerar en el estudio tanto conductual en los patrones de nado, como molecular, si se llegan a medir niveles de neurotransmisores o expresión de proteínas en ciertas zonas del hipocampo y amígdala (Morris, 1984; Vicens et al., 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios con ablación o lesión en zonas específicas, ha permitido conocer las estructuras que participan en la formación y almacenamiento de diversos tipos de memoria, incluyendo la memoria espacial. Es así que mediante lesiones electrolíticas irreversibles, directas en hipocampo dorsal y corteza prefrontal durante el entrenamiento con LA, se ha observado que existe un déficit en el proceso de su aprendizaje, particularmente los primeros días; y en la memoria a largo plazo, cuando la lesión se realiza un día después de finalizar el entrenamiento (Fig. 5) (Miyoshi et al., 2012; Compton et al., 1997). Así mismo, las lesiones electrolíticas en corteza perirrinal, entorrinal lateral o combinadas, afectan la adquisición inicial del LA, sin embargo, todos los animales lesionados son capaces de disminuir su latencia a la plataforma al nivel de los animales intactos a partir del quinto día de entrenamiento (Liu & Bilkey, 1998). En conjunto, estos resultados con lesiones, nos indican que tanto el hipocampo, la corteza prefrontal, la corteza entorrinal y la corteza perirrinal, son de gran importancia durante la formación y almacenamiento de la memoria espacial con el LA.

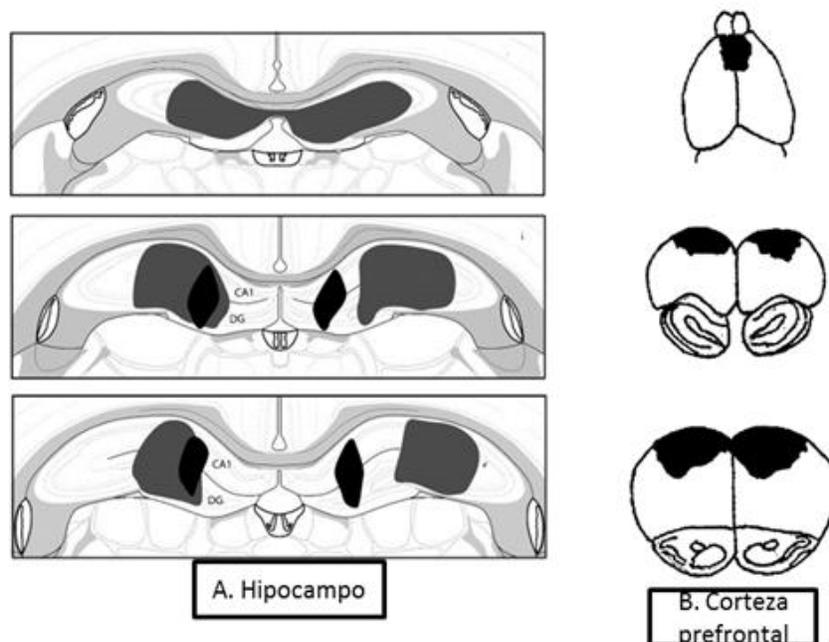


Fig. 5 Esquema representativo de dos estructuras que participan en la formación y almacenamiento de la memoria espacial. A. Hipocampo dorsal, se muestran las áreas CA1 y giro dentado (DG, por sus siglas en inglés). B. Corteza prefrontal CPF (Modificado de Miyoshi et al., 2012 & Compton et al., 1997).

Además de las estructuras implicadas en la formación y almacenamiento de la memoria espacial, se han analizado los sistemas de neurotransmisores implicados también durante la formación o mantenimiento a largo plazo. En la formación y el mantenimiento de la memoria espacial del LA, se han descrito diversos sistemas de neurotransmisión por medio del bloqueo con fármacos, ya sea de manera sistémica o intraperitoneal y local o intracerebral.

La administración intraperitoneal (i.p) del antagonista glutamatérgico NMDA, *MK801* 15 minutos antes de la sesión de entrenamiento, afecta el desempeño de los animales durante el entrenamiento con LA, aunque hacia el quinto día los animales si muestran una disminución en su latencia a la plataforma; sin embargo el mantenimiento de la memoria a largo plazo se ve afectado con respecto a los animales inyectados con salina o inmediatamente después de las sesiones de entrenamiento, lo que nos indica que el glutamato es un neurotransmisor relevante para la formación y consecuentemente para el almacenamiento de la memoria espacial (Ramírez-Amaya et al., 2001).

Aunado a estos hallazgos, se ha observado que el aumento en los niveles de acetilcolina y la disminución de serotonina en CPF derivados de la exposición crónica a plomo, generan un déficit en la MLP del LA (Mansouri et al., 2013). Mientras que la administración de un antagonista colinérgico, escopolamina, genera un déficit en el almacenamiento de la memoria a largo plazo del LA (Xiang et al., 2012); en conjunto estos resultados nos indican la importancia de la acetilcolina y serotonina en la formación de la memoria espacial a largo plazo.

Por otro lado, la inyección bilateral en CA1, del antagonista dopaminérgico *SCH23390* inmediatamente después de las sesiones de entrenamiento, afecta el desempeño de los animales a lo largo de los 5 días de adquisición, (da Silva et al., 2012); mientras que la depleción de los receptores D1 en ratones knock-out afecta la expresión de BDNF en corteza prefrontal y afecta el aprendizaje de la ubicación de la plataforma en el laberinto acuático, esto sólo sucede cuando se depletan los receptores D1 y no D3 (Xing et al., 2012), por lo que la activación de los receptores D1 en CPF permiten la formación de la memoria y la expresión de BDNF en CPF.

ANTECEDENTES

Deterioro cognitivo en animales de edad avanzada

Los animales, para sobrevivir, como se mencionó anteriormente, necesitamos del aprendizaje y la memoria para, por ejemplo, recordar en dónde llevamos a cabo una actividad determinada. Estos procesos mnemónicos se pueden ver deteriorados como consecuencia de enfermedades neurodegenerativas, de accidentes vasculares o del *proceso de envejecimiento*, entre otros factores (Grady y Craik, 2000; Barros et al., 2008)

El *proceso de envejecimiento*, es un proceso que se lleva a cabo de manera natural en los animales y que repercute en diversas funciones de su sistema. Se puede entender, a *grosso modo*, como el declive de los mecanismos homeostáticos que aseguran el buen funcionamiento celular y sistémico de los individuos (Revisado en Tevy et al., 2012). Entre las muchas consecuencias del proceso de envejecimiento natural o no asociado a enfermedades neurodegenerativas, se encuentra la afectación de procesos cognitivos; por ejemplo la afectación de diversos tipos de memoria de largo plazo, que incluye memoria espacial y de reconocimiento, o procesos como el *priming*¹, todos ellos se afectan con el envejecimiento “normal” o envejecimiento no asociado a enfermedades neurodegenerativas (Barnes; Grady & Craik, 2000; 1988; Foster et al., 2012).

Actualmente se sabe, que las memorias dependientes de hipocampo (de tipo espacial-contextual), suelen ser las más vulnerables al declive cognitivo en primates, incluyendo al humano y en modelos roedores como el ratón, rata y gerbo (Foster et al., 2012). Entre las tareas conductuales de memoria espacial que se ven afectadas por el envejecimiento, se encuentran el *condicionamiento aversivo*

¹ Priming es un tipo de memoria implícita, se refiere a los cambios que se producen en la capacidad para identificar implícitamente un ítem como consecuencia de un encuentro específico previo con dicho ítem, aún cuando el sujeto no recuerde explícitamente el ítem o el episodio en el que se le fue mostrado previamente (Tulving & Schacter, 1990).

*contextual*², el *laberinto acuático* y el *laberinto circular* (tanto adquisición como memoria a largo plazo).

Durante el *condicionamiento aversivo contextual* los animales jóvenes, de 2 meses, muestran un mayor grado de inmovilidad (tiempo en el que el animal no se mueve) con respecto a los animales viejos, de 24 meses, de tal manera que los animales jóvenes recuerdan la asociación previa de un estímulo incondicionado con un estímulo condicionado. En el caso del LA, los animales jóvenes tardan menos tiempo en encontrar la plataforma sumergida (menor latencia), mientras que los animales viejos tardan más tiempo para esta misma tarea (mayor latencia), dicho patrón se repite durante los 4 días de entrenamiento en el LA, lo que muestra que los animales viejos no aprenden la ubicación de la plataforma igual que los animales jóvenes con un entrenamiento de 4 días (Bergado et al., 2011).

El deterioro cognitivo asociado al proceso de envejecimiento, está relacionado con el daño o exacerbación de algunos procesos moleculares, neuronales y sistémicos, que se utilizan como marcadores de envejecimiento. Por ejemplo, se utiliza como marcador de envejecimiento, la disminución del metabolismo mitocondrial y el consecuente aumento del estrés oxidativo, lo que lleva a la síntesis de proteínas no funcionales y a cambios en el metabolismo energético (Villa et al., 2012). Además del metabolismo celular, durante el envejecimiento se observa que el volumen cerebral sufre una disminución de materia blanca, que es aquella que está compuesta por las fibras nerviosas (Buckner et al., 2004). Así mismo, se ha observado una disminución en los marcadores sinápticos como la proteína de densidad post-sináptica 95 (PSD-95) y de la proteína pre-sináptica vesicular sinaptofisina (SYP) en ratones. Dicha disminución se observa en hipocampo y tiene y se relaciona con la disminución en el desempeño conductual en ratones de edad avanzada y viejos, tanto en la fase de adquisición como en la MLP (Yu et al., 2011). Además de los efectos del proceso de envejecimiento observados en roedores, se ha observado una disminución de SYP en hipocampo

² Condicionamiento al miedo: tipo de aprendizaje asociativo, en el que se mide una respuesta de congelamiento dada por la asociación de un estímulo incondicionado (shock en las patas), con un estímulo condicionado (tono) (Buccafusco, 2009).

y corteza pre frontal de macacos viejos, de 23 a 31 años (Haley et al., 2010). Aunado a ello, se sabe que el déficit cognitivo en ratas se relaciona con la disminución de los potenciales excitatorios post-sinápticos³, ocasionando menos excitación sináptica (Bergado et al., 1997) además de una incapacidad de mantener la potenciación a largo plazo (LTP)⁴ y defectos en la expresión de genes tempranos, importantes para la formación de la memoria a largo plazo (revisado en Bergado y Almaguer, 2002).

³ Potenciales excitatorios post-sinápticos, también denominados despolarizantes. Son consecuencia de la apertura de canales a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , las despolarizaciones producidas por varios botones sinápticos se suman (efecto sumatorio) y de esa manera se puede producir la despolarización total de la membrana.

⁴ LTP (Potenciación a largo plazo, por sus siglas en inglés), es un proceso de potenciación sináptica que puede durar de minutos a horas y requiere de síntesis de proteínas, por lo que se utiliza para estudiar las bases moleculares de la memoria. Depende de receptores NMDA y su mantenimiento a muy largo plazo (L-LTP) requiere de la modulación por medio de receptores D1.

Incremento de las capacidades cognitivas: conducta.
Sobre entrenamiento y ambientes complejos.

Una de las grandes interrogantes en el estudio de la memoria y el aprendizaje, es cómo lograr una mayor capacidad de memoria. Existen diversas hipótesis de cómo mejorar las capacidades cognitivas en animales jóvenes, de edad avanzada y viejos. En 1999, el grupo de Bermúdez-Rattoni demostró que un sobre entrenamiento durante 4 y 5 días con el laberinto acuático en ratas jóvenes, contribuía con la formación de nuevas sinapsis en la vía de las fibras musgosas, que van del *stratum lucidum* (SL) hacia el *stratum oriens* (SO) (Fig 6), fenómeno que no se observó en animales con un solo día de entrenamiento o en animales control (sin aprendizaje) (Ramírez-Amaya et. al., 1999).

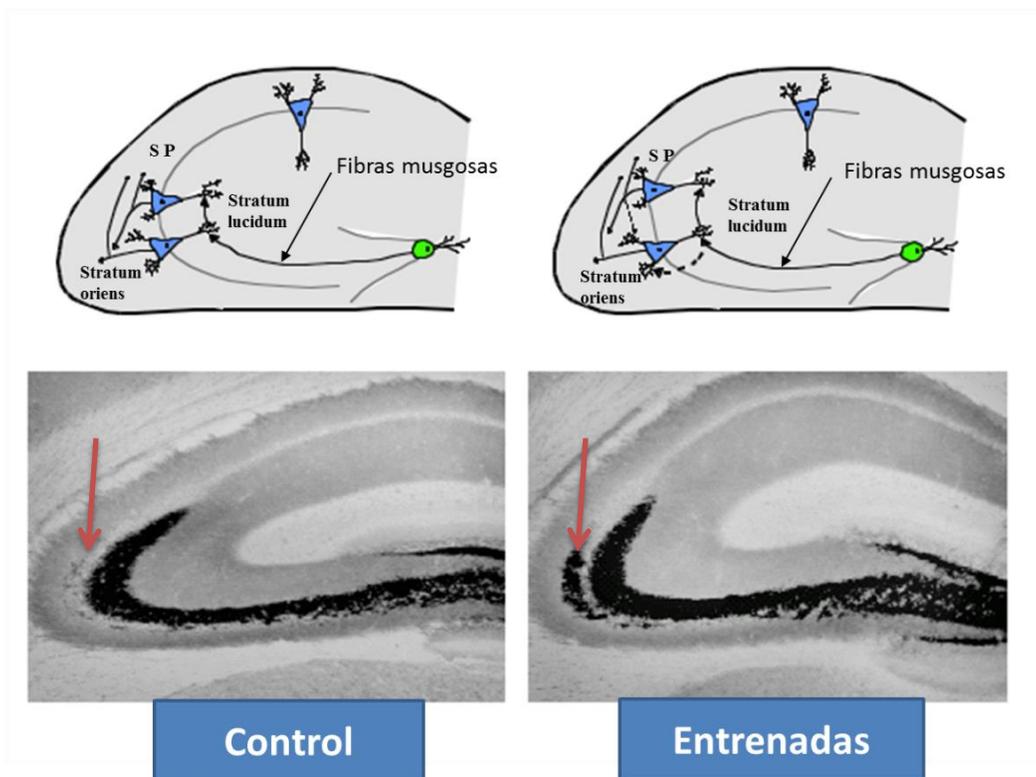


Fig. 6 Se muestra la formación de una doble banda en ratas sobre entrenadas en el laberinto acuático, con respecto a ratas controles. Dicha banda va del *stratum lucidum* (sl) al *stratum oriens* (so) (Modificado de Ramírez-Amaya et al., 1999).

Aunado a ello, se demostró que los animales sobre entrenados, tenían un mejor desempeño durante la MLP, la cual lograban mantener desde 7 y hasta 30 días posteriores al entrenamiento (Fig. 7A y B) (Ramírez-Amaya et al., 2001).

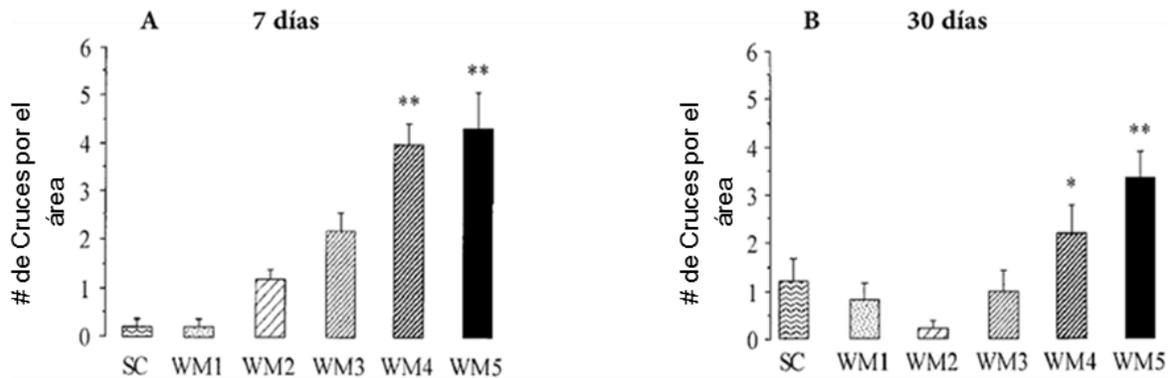


Fig. 7 Mantenimiento de la Memoria de Largo Plazo (MLP) 7 (A) y 30 días (B) post entrenamiento. (Ramírez-Amaya et al., 2001).

Además de los cambios conductuales y morfológicos producidos por el entrenamiento, existe evidencia que muestra que la exposición a un ambiente enriquecido⁵ complejo (con varios niveles dentro de la caja, equipada con material para anidar, con juegos y objetos de diferentes texturas), produce un aumento en la capacidad para aprender la ubicación de la plataforma durante el entrenamiento del LA (Moser et al., 1997). De manera complementaria, se ha demostrado que tanto el sobre entrenamiento en el LA como la exposición a un ambiente complejo, producen un aumento en la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo de animales adultos (Moser et al., 1994 y 1997).

La estimulación conductual por medio de entrenamiento, se ha utilizado también en modelos para enfermedades neurodegenerativas. En un modelo para estudiar la enfermedad de Alzheimer, el entrenamiento previo en el LA logra aumentar el desempeño de los animales cuando son sometidos a un entrenamiento posterior al desarrollo de la patología, dicha mejora se logra en el entrenamiento y en la

⁵ Un *ambiente enriquecido* es un entorno que estimula de manera compleja a un animal de laboratorio, que regularmente se encuentra en condiciones estándar de hábitat.

memoria a largo plazo en esta misma tarea (Li, et al., 2011). Esta pre exposición al LA también tiene efecto positivo en animales muy jóvenes que son estimulados tempranamente. De tal manera que el entrenamiento en la etapa postnatal por 11 días durante en su primer mes de vida, lleva al animal a mostrar un mejor desempeño en su etapa juvenil (2 meses de edad) durante la búsqueda de la plataforma sumergida, en el entrenamiento con LA. Este efecto se ve acompañado de un aumento del marcador sináptico SYP en el stratum oriens de CA3 en hipocampo (Keeley, et al., 2010), una zona que participa en el mantenimiento de la memoria espacial a largo plazo.

Hasta este punto, la información indica que el sobre entrenamiento con una tarea conductual como el LA, genera una mayor retención de la memoria a largo y muy largo plazo. También nos indica que la estimulación durante un periodo largo en etapas tempranas, con ambientes diversos y complejos, contribuye con mejoras conductuales, específicamente en memorias espaciales.

La estimulación con ambiente enriquecido produce un aumento en la capacidad de aprender y mantener una memoria a largo o muy largo plazo, lo cual se encuentra estrechamente relacionado con el aumento de los niveles de factores neurotróficos como BDNF, NGF y NT-3; así como de las hormonas corticosterona o adrenocorticotropina; que participan en la formación y mantenimiento de procesos cognitivos (Simpson & Kelly, 2011). En 2003, como parte de una serie de experimentos con envejecimiento, Fick y Fernández estimularon con ambiente enriquecido, a ratones de la cepa C57BL/6, por un periodo de 23 días durante 3 horas diarias. El resultado fue una mejora en la memoria espacial de los animales viejos, con respecto al grupo de la misma edad sin dicho pre-estímulo. Además se ha reportado que los animales de edad avanzada que se han expuesto a un ambiente enriquecido, muestran mayor inmunoreactividad al marcador sináptico SYP en corteza frontoparietal e hipocampo, con respecto a aquellos animales que no fueron pre-expuestos a dicho ambiente; este antecedente es de gran importancia, ya que las cortezas analizadas (anteriormente mencionadas), participan directamente en el aprendizaje y consolidación del LAM. Aunado a estos efectos, cuando el ambiente enriquecido es aplicado a animales que normalmente no se desempeñan satisfactoriamente en el LA, como los ratones de

la cepa 129/SvJ, esta pre-exposición aumenta la capacidad de los animales de aprender la ubicación de la plataforma durante el entrenamiento; lo cual se relaciona con el aumento en la neurogénesis en giro dentado (Kempermann et al., 1998).

Incremento de las capacidades cognitivas: farmacología.

El sistema dopaminérgico: dopamina y receptores.

La dopamina es un neurotransmisor que forma parte del grupo de las catecolaminas, caracterizadas por la presencia de un grupo catecol ($C_6H_4(OH)_2$) y por su síntesis a partir del aminoácido esencial L-Tirosina. Se libera al medio extracelular por medio de vesículas, que son denominadas vesículas monoaminérgicas (Fig. 8) (Siegel et al., 2006).

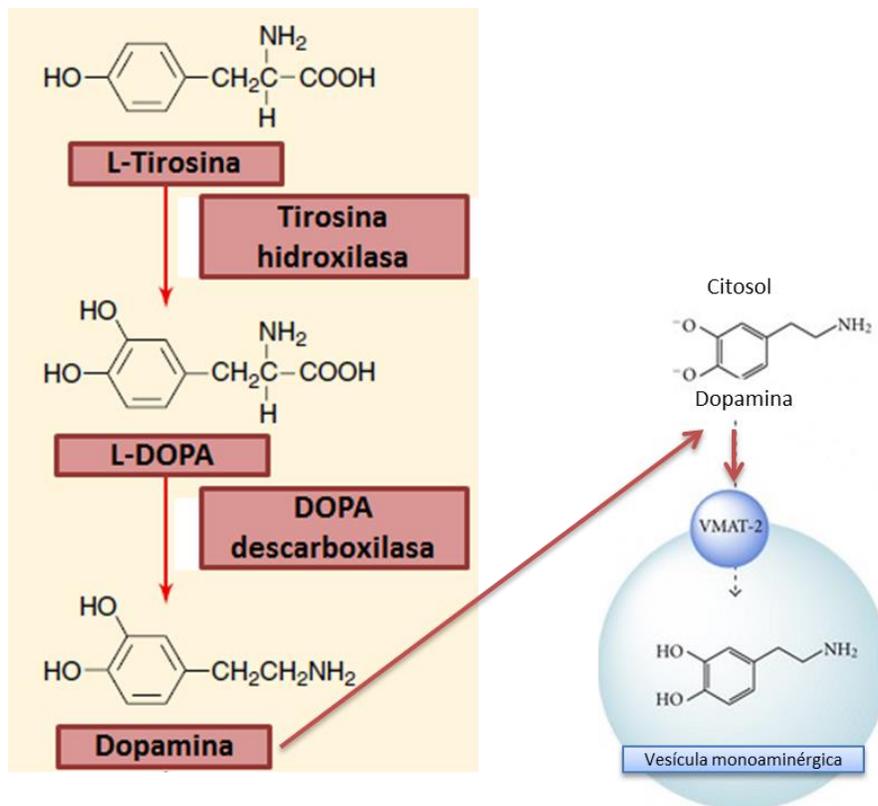


Fig. 8 Síntesis de dopamina a partir del aminoácido L-Tirosina (izquierda); Vesícula monoaminérgica (derecha), que alberga dopamina del citosol hacia el interior de ésta para finalmente poder liberar el neurotransmisor al espacio sináptico (Modificado de Muñoz et al., 2012 y Siegel et al., 2006).

Dicho neurotransmisor se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y puede actuar ya sea como neurotransmisor o como hormona (Siegel et al., 2006). Las inervaciones dopaminérgicas son muy abundantes y se han identificado cuatro inervaciones en el cerebro de mamíferos: la nigroestriatal, la mesolímbica, la mesocortical y la tuberoinfundibular. Una vez liberada de las terminales presinápticas hacia el espacio sináptico, la dopamina actúa sobre receptores acoplados a proteína-G (GPCRs), siendo los del tipo D1 (D1 y D5), post sinápticos. La actividad se da por medio de $G_{as/olf}$, que estimula la producción de AMPc por medio de la adenilato ciclasa (AC), y son exclusivamente postsinápticos. Los receptores del tipo D2 (D2, D3 y D4) pueden ser postsinápticos en células *blanco* dopaminérgicas, y presinápticos en neuronas dopaminérgicas, actuando con una *retroalimentación* negativa a bajas concentraciones de dopamina. Los receptores del tipo D2, actúan sobre $G_{ai/o}$, (Fig. 9) inhibiendo a la AC, es decir, inhibiendo la actividad de señalización intraneuronal (Revisado en Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

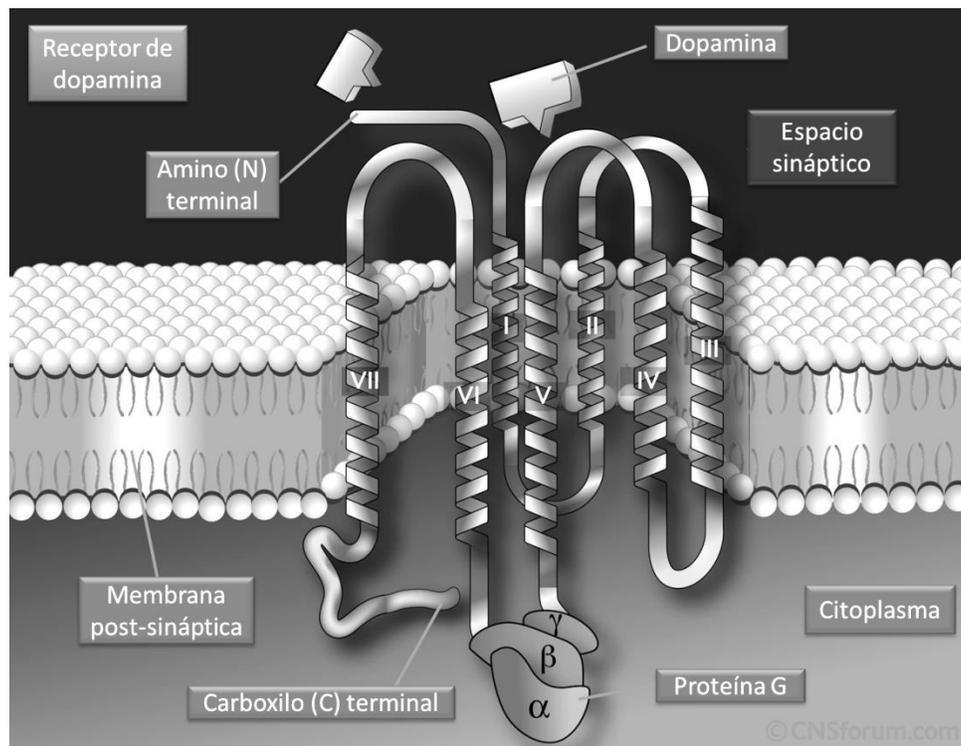


Fig. 9 Receptor dopaminérgico que se constituye, de manera general, por una proteína de siete dominios transmembranales. Se encuentra acoplado a una proteína G, con sus 3 subunidades alfa, beta y gama, que actúan en el citoplasma (Modificado de CNSforum).

Importancia del sistema dopaminérgico en la memoria y en la plasticidad sináptica.

Actualmente se sabe que los cambios en el comportamiento, dependientes de la experiencia, derivan, en gran medida, de cambios en la fuerza sináptica y excitabilidad neuronal. La modificación sináptica a largo plazo como la LTP, requiere de síntesis de proteínas y se encuentra ampliamente relacionada con procesos de aprendizaje y memoria (Escobar & Derrick, 2007). Durante el estudio de la plasticidad se han hecho hallazgos sobre el papel de diversos sistemas de neurotransmisión, entre ellos el sistema dopaminérgico, al cual se le atribuye un papel como neuromodulador de procesos plásticos y cognitivos, como el mantenimiento de la memoria a largo y muy largo plazo.

Se ha establecido una relación entre la dopamina y la regulación de respuestas celulares, por medio de la aplicación de agonistas dopaminérgicos y dopamina *in vivo* e *in vitro* en células piramidales de CA1, ya que la aplicación de dopamina en cultivos celulares, produce un aumento de potenciales excitatorios post-sinápticos, y un mayor tiempo en el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (Revisado en Jay, 2003). Además de la información que deriva del estudio de la plasticidad sináptica y del rol de la dopamina en ésta, se han ido descubriendo algunos componentes de la participación de la dopamina en diversos procesos cognitivos. Al realizar microdialisis⁶ a un grupo de pacientes durante la ejecución de una lectura secuencial de palabras, con la medición de la memoria de trabajo de dicha lectura; se observó un aumento significativo en los niveles de dopamina durante la actividad cognitiva en amígdala central y basolateral, con respecto a los niveles basales sin actividad cognitiva, ello podría estar relacionado a varios factores como la novedad del estímulo, la atención y la motivación, así como al aprendizaje *per se* (Fried et al, 2001).

⁶ Microdialisis: Técnica que consiste en implantar una cánula para dializar moléculas en zonas específicas del cerebro. Esta técnica permite el análisis en libre movimiento y la infusión de fármacos durante tareas conductuales.

Aunado a ello es importante recalcar que la dopamina participa en la consolidación de tareas cognitivas como el reconocimiento de objetos (RO), ya que, entre otros antecedentes, se ha observado que la microinyección de un antagonista D1 (*SCH23390*) produce afectación sólo en el almacenamiento de la memoria a largo plazo, no así en la memoria de corto plazo. Esta consolidación a largo plazo por medio de los receptores D1, se relacionan estrechamente con el aumento de pERK1/2, permitiendo de esa manera mantener las memorias a largo plazo (Balderas et al., 2013; Nagai et al., 2007).

Mantenimiento de la memoria a largo plazo y mejoras conductuales producidas a través del sistema dopaminérgico.

Si bien la memoria es el almacenamiento de la información adquirida durante el aprendizaje, su mantenimiento a largo plazo es un atributo de enorme relevancia para los grupos que la estudian (Dudai, 2002). La dopamina ha demostrado relevante durante la consolidación de la memoria. Se sabe que la actividad del receptor D1 en hipocampo, es necesaria para el aprendizaje espacial, ya que ratones knock out para el receptor D1^{-/-}, no son capaces de aprender la tarea espacial del laberinto de agua, de manera contraria a animales sin mutación alguna o con la mutación D3^{-/-}. Aunado a ello, los animales D1^{-/-} muestran un déficit en la memoria de largo plazo y en su mantenimiento por 7 y 14 días, lo que se relaciona con una menor activación de p-ERK (Xing et al, 2010). Existen, además, trabajos con los fármacos *SKF38393* y *SCH23390* (agonista y antagonista D1, respectivamente), que muestran la importancia del sistema dopaminérgico en la formación de la memoria espacial del laberinto de agua. Su importancia radica, particularmente, en la modulación post-entrenamiento, durante la fase de consolidación, ya que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos del tipo 1 (D1), afectan el aprendizaje a partir del tercer y hasta el quinto día de entrenamiento, así como la memoria a largo plazo, aumentando la latencia de llegada a la plataforma y disminuyendo el tiempo que nadan los animales en el cuadrante de interés (en el cual se ubicaba la plataforma). Aunado a ello el sistema dopaminérgico no sólo participa en la formación de la memoria a largo plazo, sino que puede ayudar a su consolidación en menos días de entrenamiento (2 días), durante los cuales se les administró el agonista *SKF38393* intra-CA1, inmediatamente después del entrenamiento. Lo que se obtuvo, es que los animales tratados con el agonista dopaminérgico muestren mayor retención de la memoria a largo plazo, con respecto a los animales tratados con solución salina isotónica, comprobando que dicha regulación dopaminérgica contribuye con la formación de la memoria y puede tener efectos farmacológicos positivos (da Silva et al., 2012).

Además del efecto que tiene la dopamina en la consolidación de la memoria, se sabe que puede tener un efecto potenciador de ésta a muy largo plazo. La aplicación del agonista dopaminérgico *SKF38393* intra-hipocampal, en un periodo crítico de 12 horas después del entrenamiento con evitación pasiva, promueve que una memoria poco persistente, logre ser mantenida mucho más tiempo. Dicho potenciamiento se relaciona con el aumento de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés). De esta manera se puede establecer que la dopamina no sólo participa en la consolidación de la memoria, sino que también participa en su mantenimiento a largo plazo y muy largo plazo (Rossato, et al., 2009).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las evidencias muestran que el envejecimiento se asocia a un déficit cognitivo en diversas especies animales entre ellas el ratón. Por otro lado, sabemos que el sobre entrenamiento en animales jóvenes provoca un aumento en la consolidación de la memoria, manteniéndola a largo plazo, en animales jóvenes. Además, se ha demostrado que la dopamina es un neuromodulador que contribuye con la formación y mantenimiento de la memoria a largo plazo por medio de los receptores D1. Aunado a ello, existen evidencias que muestran la participación de la DA como neuromodulador, en el mantenimiento y formación de la MLP. Ya que la estimulación del sistema dopaminérgico por medio de los receptores D1, tiene efectos positivos en la memoria a largo plazo, particularmente en su mantenimiento, no así en la de corto plazo. En conjunto, la información nos llevó a preguntarnos si era posible potenciar la memoria de largo plazo, por medio de la estimulación del sistema dopaminérgico, durante un entrenamiento o sobre entrenamiento con LA en animales de edad avanzada.

HIPÓTESIS

Un entrenamiento prolongado con laberinto acuático contribuirá a mejorar la consolidación de la memoria a largo plazo en animales jóvenes, así mismo, esperamos un efecto en el almacenamiento a largo plazo de la memoria espacial en animales de edad avanzada. Además se espera que la administración de un agonista dopaminérgico, potencie el almacenamiento de la memoria a largo plazo en animales de edad avanzada, acercando su desempeño al de los animales jóvenes.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el desempeño conductual de un modelo murino a diferentes edades (4 y 9 meses) durante el entrenamiento con Laberinto acuático (LA), así como la memoria espacial a largo plazo, contrastando los efectos de un entrenamiento corto y uno prolongado en cada edad. Así mismo analizar el desempeño conductual bajo las mismas condiciones más la administración sistémica post-adquisición del agonista dopaminérgico SKF38393, durante todo el entrenamiento.

Objetivos particulares

- a) Evaluar el desempeño conductual de ratones jóvenes y de edad avanzada, con un entrenamiento corto y con un entrenamiento prolongado en el LA.
- b) Evaluar la memoria a largo plazo, comparando el desempeño de animales: entrenados por un periodo corto, con animales entrenados por un periodo prolongado; así como entre animales jóvenes y de edad avanzada.
- c) Evaluar el desempeño conductual de ratones de edad avanzada administrados con SKF38393 post-adquisición, durante los protocolos corto y prolongado en el LA.
- d) Evaluar la memoria a largo plazo, comparando el desempeño de animales administrados con SKF38393 post adquisición con respecto al desempeño de los animales jóvenes, en ambos protocolos de entrenamiento.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Modelo animal

Se utilizaron 33 ratones de la cepa CD1, ratón albino utilizado ampliamente en investigaciones sobre envejecimiento (Charles River), divididos en 6 grupos de estudio de acuerdo al protocolo de entrenamiento y al fármaco administrado. Para el protocolo de entrenamiento corto se dividieron a los sujetos en 3 grupos: solución salina 9 meses (**EC/SS 9m**), agonista dopaminérgico 9 meses (**EC/SKF 9meses**) y solución salina 4 meses (**EC/SS 4m**). Para el protocolo de entrenamiento prolongado se dividieron de igual manera a los sujetos en 3 grupos: solución salina 9 meses (**EP/SS 9m**), agonista dopaminérgico 9 meses (**EP/SKF 9m**) y solución salina 4 meses (**EP/SS 4m**).

Cuadro 2. Agrupación del modelo de estudio, por edad y protocolo de LA realizado.		
EDAD	Protocolos de entrenamiento	
	Entrenamiento corto (EC)	Entrenamiento prologado (EP)
4 meses (jóvenes)	SS n= 5	SS n= 5
9 meses (edad avanzada)	SS n= 5 / SKF n= 6	SS n= 5 / SKF n= 7

Laberinto acuático (LA)

El LAM consiste en un tanque circular lleno con agua y contiene una plataforma *oculta* de 0.5 a 1cm debajo de su superficie. Para realizar la tarea el tanque se divide imaginariamente en 4 cuadrantes de acuerdo a la posición de la plataforma (Fig 6 A y C) y, con ayuda de claves espaciales, que se colocan alrededor del tanque, los animales deben aprender a llegar a la plataforma a lo largo de varios días de entrenamiento con cuatro ensayos diarios (Fig. 6) (Morris, 1984). La plataforma tiene un área de 144cm^2 , ésta no debe notarse a través del agua, por lo que se disuelve pintura blanca no tóxica (Fig. 6B y C).

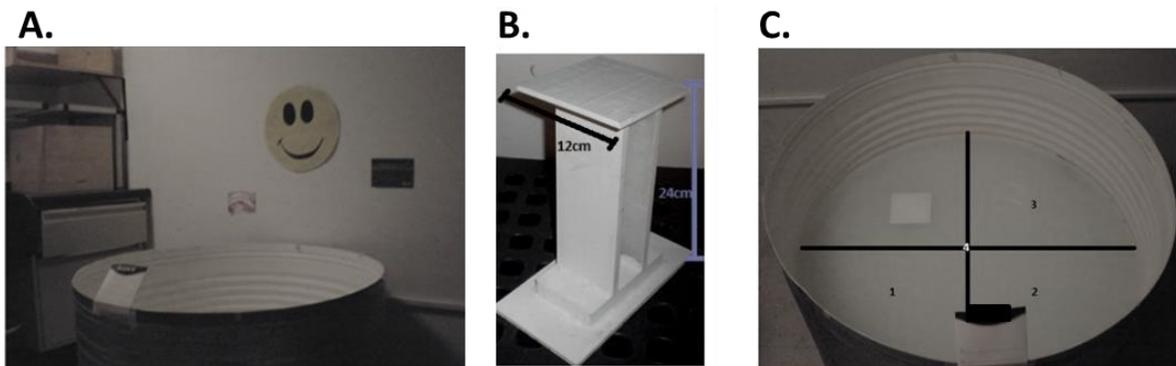


Fig. 6 Equipo para realizar el Laberinto Acuático (LA), A) Tanque rodeado de claves espaciales. B) Plataforma que se coloca en uno de los cuatro cuadrantes. C) División imaginaria en cuadrantes del tanque de LA con ubicación de la plataforma.

Se utilizaron dos protocolos de entrenamiento (entrenamiento corto y entrenamiento prolongado). El protocolo de entrenamiento corto (EC) se llevó a cabo durante 4 días con cuatro ensayos cada día, mientras que el de entrenamiento prolongado (EP), se realizó durante 9 días con la misma cantidad de ensayos por día (Fig. 7). En cada ensayo, el ratón se coloca 60s en el agua para que encuentre la plataforma, si no es así se le coloca 10s en ésta antes del siguiente ensayo. Entre cada ensayo se deja reposar al animal durante 30s. Cada ensayo se ejecuta desde diferentes cuadrantes. Cinco días después del último día de entrenamiento (corto o prolongado) se realiza la memoria de largo plazo (MLP), en la que se repite el procedimiento, esta vez sin la plataforma.

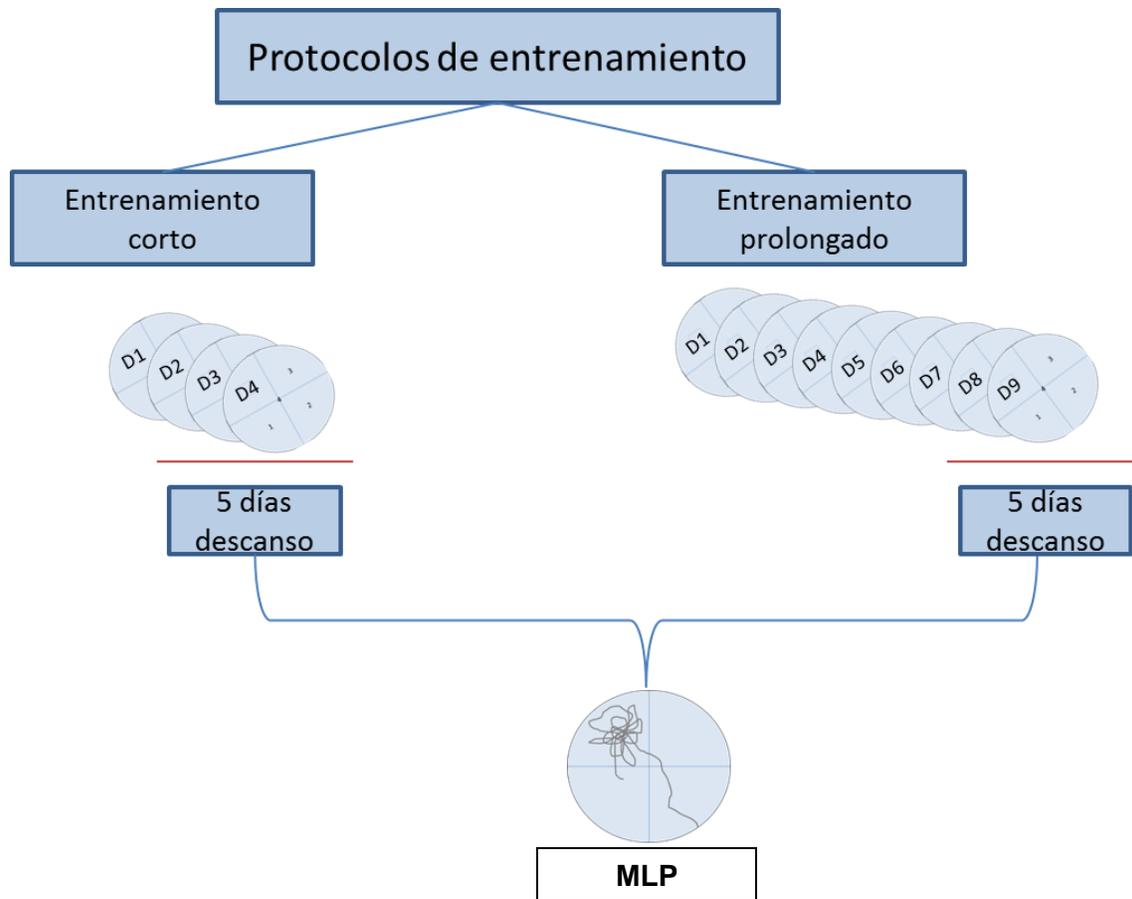


Fig. 7 Protocolos de entrenamiento en el LA: corto (4 días) y largo (9 días), descanso de 5 días y análisis de la memoria de largo plazo.

En la MLP se cuenta el número de veces que cruzan por el área específica donde se ubicaba la plataforma (*número de cruces*), el tiempo que tardan en llegar al cuadrante en donde se ubicaba (*latencia al cuadrante blanco*), el tiempo que tardan en llegar a la zona específica de ubicación de la plataforma (*latencia a la plataforma*) y el *tiempo total* en el cuadrante de interés.

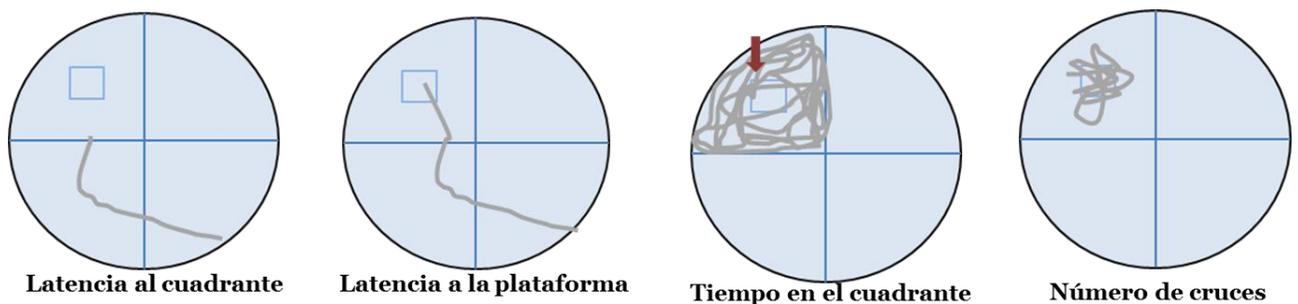


Fig. 8 Medidas estándar para el análisis conductual en el LA, las dos más utilizadas son número de cruces y latencia a la plataforma.

Entrenamiento con LA y administración de fármacos.

Se realizaron los protocolos mencionados anteriormente (EC y EP). A lo largo de todo el entrenamiento (4 o 9 días), se les administró a los animales el fármaco (\pm)-**SKF 38393** hydrochloride (SKF) (Sigma- Aldrich). La vía de administración fue intraperitoneal (i.p.) en una concentración de 6mg/Kg, disuelto en solución salina 0.9% y 0.1% de DMSO (**Grupos SKF**). Como control utilizamos la inyección i.p. de solución salina 0.9% con 0.1% de DMSO (**Grupos SS**). Las inyecciones i.p. se realizaron inmediatamente después del último ensayo cada día de entrenamiento, durante los 4 o 9 días, según el grupo de estudio.

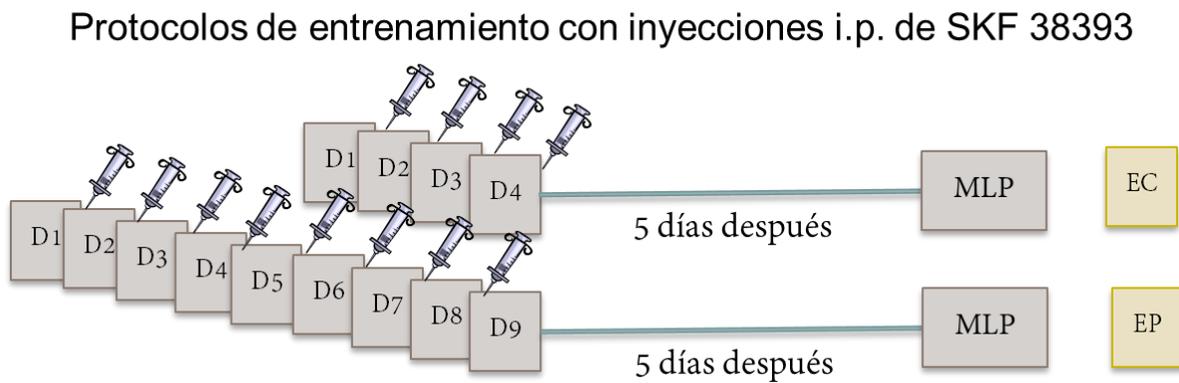


Fig. 11 Protocolos de entrenamiento con inyecciones intraperitoneales, aplicadas después del último ensayo, cada día de entrenamiento con el laberinto acuático.

Análisis de datos

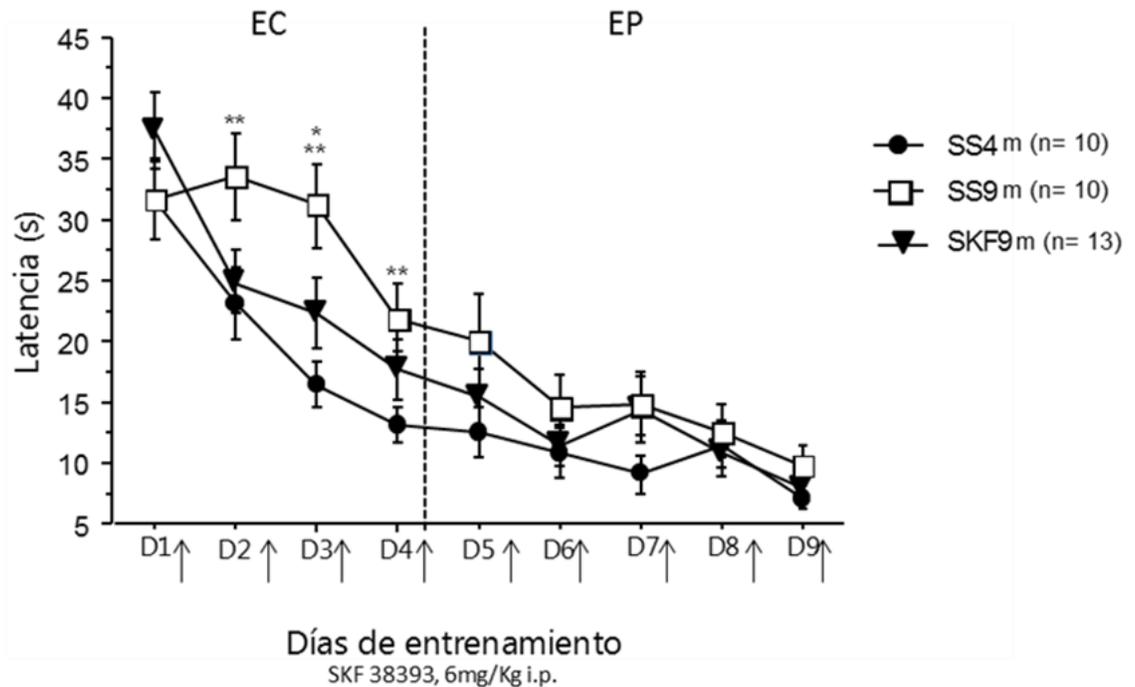
Tanto el entrenamiento como la MLP fueron videograbados con una cámara digital Olympus FE-320/X-835/C-540. Los videos se analizaron manualmente, con un Triple-display clock/timer (Cole-Parmer, EW-94440-00). Durante el entrenamiento se midió (en segundos) la latencia de llegada a la plataforma en cada ensayo durante los 4 o 9 días, según el protocolo. Para la MLP se midieron, las latencias de llegada a la plataforma y el número de cruces a través del área de interés. Todos los datos se muestran como la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se empleó un ANOVA-de dos vías con análisis post-hoc de Fisher, comparando grupos (edades) por días de entrenamiento (durante los 4 o 9 días de entrenamiento), y por edades y tratamiento farmacológico durante la MLP. Se consideró significativo con $p < 0.05$. El análisis se llevó acabo utilizando el paquete estadístico Statview 4.57.

RESULTADOS

Efecto de la administración de un agonista D1 en el entrenamiento con LA, en ratones de edad avanzada.

El análisis de la administración del agonista dopaminérgico SKF 38393 o el vehículo (solución salina 0.9%) inmediatamente después del entrenamiento, durante ambos protocolos, demuestra que durante los días 2, 3 y 4 de entrenamiento, hubo una reducción estadísticamente significativa en la latencia de llegada a la plataforma, por parte del grupo de edad avanzada que recibió el agonista SKF (SKF9m), con respecto al que recibió solución salina (SS9m) (D2 SS4m/SS9m $F_{(2,89)}= 1.986$, $p<0.01$; D3 SS4m/SS9m $F_{(2,88)}= 7.365$, $p<0.01$; SKF9m/SS9m $F_{(2,88)}= 7.365$, $p<0.01$; D4 SS4m/SS9m $F_{(2,89)}= 2.829$, $p<0.01$). A partir del quinto día de entrenamiento, los grupos se mostraron homogéneos y llegaron a una *asíntota de aprendizaje*, en donde ya no se muestran cambios entre sus latencias de llegada a la plataforma entre edades. (Gráfica 1).

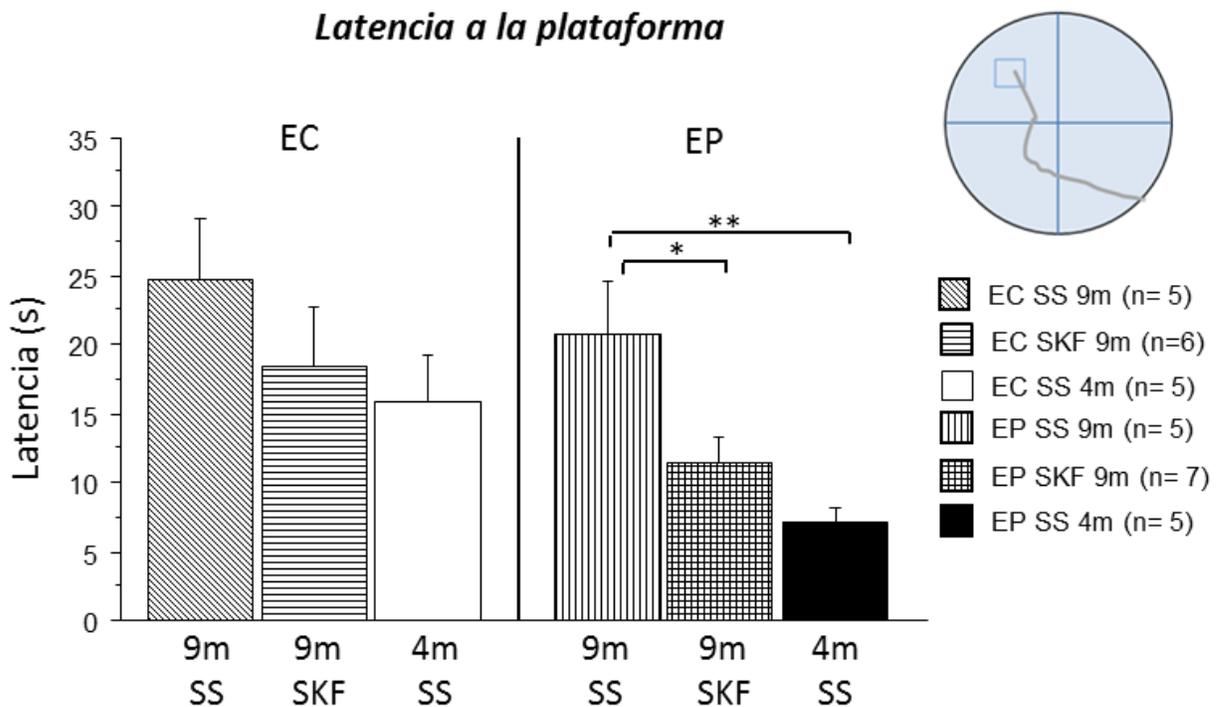
Efecto de la administración del agonista dopaminérgico SKF38393 en el entrenamiento con LA.



Gráfica 1. Se muestra la latencia de llegada a la plataforma, durante los días de entrenamiento corto (EC) y entrenamiento prolongado (EP), de los grupos 4 meses inyectados con vehículo (SS 4); 9 meses inyectados con solución salina (SS9) y 9 meses inyectados con SKF (SKF9). Los animales aprenden la ubicación de la plataforma durante el entrenamiento, al mostrar una disminución de la latencia con respecto al primer día de entrenamiento. Durante los días 2, 3 y 4 los animales SS4m y SS9m muestran diferencias significativas, mientras que el grupo inyectado con SKF de 9 meses, tiende a disminuir la latencia de llegada durante los primeros 4 días, con respecto al grupo SS de 9 meses (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

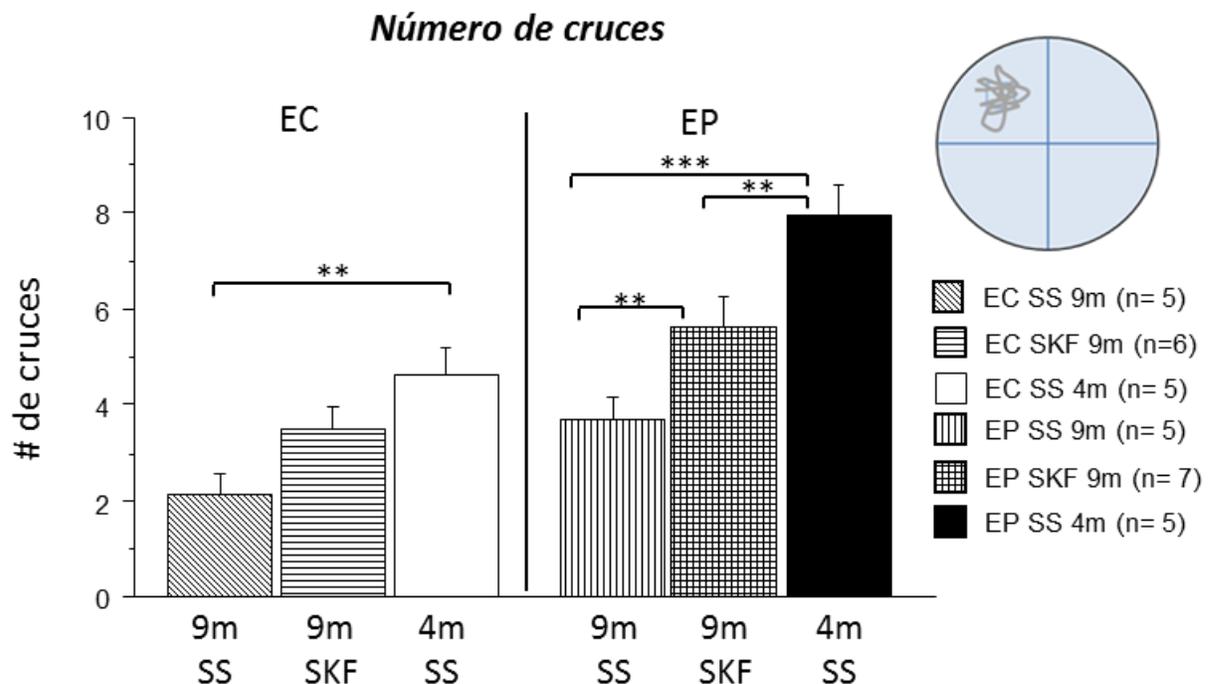
Efecto de la administración de un agonista D1 en el almacenamiento de la memoria a largo plazo, en ratones de edad avanzada.

El análisis de la latencia a la plataforma en la memoria a largo plazo (Gráfica 2) muestra que los animales de edad avanzada administrados con el agonista dopaminérgico y con un entrenamiento prolongado, disminuyen su tiempo de llegada a la plataforma, incluso al nivel de los animales jóvenes también con entrenamiento prolongado, así mismo los animales de edad avanzada con EP pero con SS muestran diferencias significativas, con una mayor latencia de llegada a la plataforma con respecto a los animales jóvenes y de edad avanzada con SKF. Mientras que los animales con entrenamiento corto no muestran diferencias entre significativas entre sí (EC SKF9m/EP SS4m, $F_{(7, 160)} = 3.690$, $p < 0.05$; EC SS9m/EP SKF9m, $F_{(7, 160)} = 3.690$, $p < 0.01$; EC SS9m/EP SS4m, $F_{(7, 160)} = 3.690$, $p < 0.001$; EP SKF9m/EP SS9m, $F_{(7, 160)} = 3.690$, $p < 0.05$; EC SKF9m/EP SS4m, $F_{(7, 160)} = 3.690$, $p < 0.05$; EP SS4m/EP SS9m, $F_{(7, 160)} = 3.690$, $p < 0.01$).



Gráfica 2. Latencia a la plataforma, durante la prueba de memoria a largo plazo. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

El análisis del número de cruces por el área en donde se ubicaba la plataforma, muestra diferencias significativas entre los animales jóvenes con entrenamiento prolongado y el resto de los animales, ya que presentan un mayor número de cruces por el área de interés. Pese a ello, los animales de edad avanzada administrados con SKF (EP SKF9m) y con un entrenamiento prolongado, muestran un aumento en el número de cruces, siendo significativamente distintos al grupo de animales de la misma edad y entrenamiento pero con solución salina. En el caso de los animales con entrenamiento corto sólo se muestran diferencias significativas entre los animales de edad avanzada administrados con solución salina y los animales jóvenes (Gráfica 3) (EC SKF9m/EP SKF9m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.01$; EC SKF9m/EP SS4m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.001$; EC SS4m/EP SS9m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.01$; EC SS4m/EP SS4m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.001$; EC SS9m/EP SKF9m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.001$; EC SS9m/EP SS4m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.001$; EP SKF9m/EP SS4m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.01$; EP SS4m/EP SS9m, $F_{(7,160)}= 9.885$, $p<0.001$).



Gráfica 3. Número de cruces por el área en donde se ubicaba la plataforma, durante la prueba de memoria a largo plazo. Izquierda: Animales con entrenamiento corto (EC). Derecha: Animales con entrenamiento prolongado (EP). (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

DISCUSIÓN

Durante el proceso de envejecimiento, la capacidad de consolidar las memorias episódicas disminuye. De acuerdo a los antecedentes el objetivo principal de este trabajo fue analizar el desempeño de los animales de edad avanzada en una tarea espacial como el LA, bajo diversas circunstancias como un entrenamiento prolongado o la administración de un agonista dopaminérgico (SKF38393).

De acuerdo a las evidencias experimentales, la potenciación de las capacidades cognitivas es posible en animales jóvenes por medio de diversas técnicas como sobre entrenamiento, ambiente enriquecido y estimulación farmacológica (Ramírez-Amaya et al., 1999; Kempermann et al., 1998), así como en animales viejos por ambiente enriquecido (Frick y Fernández, 2003). Sin embargo poco se había estudiado el efecto del entrenamiento y de la estimulación farmacológica con agonistas dopaminérgicos en animales de edad avanzada (reportados como middle-aged), que inician con el déficit cognitivo alrededor de los 8 a 9 meses de edad (Kaczorowski & Disterhoft, 2009).

Efecto del EC y EP sobre la fase de adquisición del LA.

De acuerdo a estudios anteriores en los que se ha evaluado el proceso de envejecimiento y el desempeño en el LA, al entrenar a ratones viejos de alrededor de 24 meses durante un periodo de 4 días, éstos mostraban mayores latencias de llegada a la plataformas durante dicha fase de entrenamiento, comparados con animales de 2 meses de edad, que mostraban latencias de llegada a plataforma menores, esta diferencia puede ser traducida como un déficit durante el aprendizaje de la tarea en animales viejos (Bergado et al., 2011). Nuestros resultados muestran que dicho déficit, para adquirir la tarea, puede ser visible con esta tarea de navegación espacial, a partir de los 9 meses de edad en modelos murinos, ya que durante los primeros cuatro días de entrenamiento los animales de edad avanzada (9m) presentan diferencias con respecto a los animales jóvenes (4m); sin embargo, dicho déficit durante el entrenamiento puede verse eliminado,

cuando los animales de 9m son entrenados de manera prolongada durante 9 días. El EP lleva a todos los animales de 9 y 4 meses a una asíntota de aprendizaje a partir del 5° día de entrenamiento. De tal manera que, aún cuando los animales de 9m presentan un déficit en el aprendizaje durante el entrenamiento corto, después de 5 días de entrenamiento, al llegar a la asíntota de aprendizaje, pueden aprender la ubicación de la plataforma de igual manera que los animales de 4m.

Además del déficit que los animales muestran en la memoria de navegación espacial, se ha encontrado evidencia de un déficit en el aprendizaje asociativo espacial en animales de 8 meses de edad, lo cual se relaciona con un deterioro en la hiperpolarización subsecuente al disparo neuronal (post- burst after hyperpolarization, AHP por sus siglas en inglés) que es un mecanismo que subyace los procesos de aprendizaje y memoria, estabilizando o modulando la actividad neuronal (Kaczorowski & Disterhoft, 2009). Esto sugiere que, a partir de los 8 meses de edad, las neuronas de estos animales no pueden modular su actividad de estabilización después del disparo neuronal, lo que podría provocar una interrupción en el proceso de consolidación de la memoria.

Efecto del EP sobre la memoria espacial a largo plazo.

La búsqueda de un mecanismo que mejore la consolidación de la memoria ha llevado a indagar sobre diversos métodos que puedan hacerlo posible. Algunos de ellos se centran en la estimulación con una tarea conductual o la exposición a ambientes complejos. Actualmente se sabe que un sobre entrenamiento en el LA produce un mantenimiento de la memoria desde 7 y hasta 30 días post-adquisición (Ramírez-Amaya et al., 2001). Además, está documentado que un estímulo fuerte, como el derivado del entrenamiento con evitación inhibitoria⁷ produce un mantenimiento de la memoria desde 2, 7 y hasta 14 días (Rossato et al., 2009).

⁷ Evitación inhibitoria:

Nuestros resultados indican que el EP produce una mejor ejecución durante la prueba de MLP, particularmente en animales de 4m, no así en los de 9m. Estas diferencias, relacionadas a la pérdida gradual de la capacidad cognitiva, podrían ser mejoradas por medio de estimulación farmacológica o por medio de un pre-entrenamiento de los animales en etapas juveniles, derivando en una mejora en la adquisición y en la retención de la memoria espacial a largo plazo en su edad avanzada (Vicens et al., 2002, Vicens et al., 1999).

Los antecedentes nos indican que el entrenamiento temprano, en etapas juveniles, es más efectivo que el entrenamiento prolongado en etapas adultas maduras. A pesar de los hallazgos tan contundentes que muestran que el entrenamiento con LA en etapas juveniles y adultas puede producir: sinaptogénesis, aumento de MAP-2 y una redistribución axonal en la vía de las fibras musgosas (Ramírez-Amaya et al., 1999 y 2001; Keeley et al., 2010), las mejoras conductuales no pueden apreciarse en animales de 9m o de edad avanzada, sugiriendo una desregulación en los procesos que permiten a la consolidación de la memoria espacial a largo plazo.

Efecto de la administración de un agonista dopaminérgico D1 durante el entrenamiento en el LA.

Al ser de diversas índoles los orígenes del deterioro cognitivo en animales de edad avanzada, es complicado orientarse por un solo factor modificable. Sin embargo, dado que el sistema dopaminérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión afectados por el proceso de envejecimiento y que se relacionan con el mantenimiento y, más importante, la modulación de la memoria (Jay, 2003; Mizoguchi et al., 2009), uno de las vertientes del presente trabajo se enfoca en la estimulación del sistema dopaminérgico de manera sistémica durante los protocolos de EC y EP en el LA y los beneficios que ésta puede otorgar.

La dopamina (DA) es un neurotransmisor que modula, entre otros procesos cognitivos, el mantenimiento de la memoria a largo y a muy largo plazo (Rossato et al., 2009) y la formación de tareas espaciales y dependientes de hipocampo en roedores (Voller et al., 2008; da Silva et al., 2012). Esto ha propuesto a la dopamina como un neurotransmisor que puede ser utilizado como un *enhancer* del desempeño cognitivo en diversas tareas en humanos y roedores, utilizando: inhibidores de la recaptura de la DA, agonistas dopaminérgicos o inhibidores de la degradación de DA (da Silva et al., 2012; Sofuoglu, et al., 2013; Guzmán-Ramos, et. al., 2012). Es por ello que la segunda parte de la discusión, se centrará en el efecto del agonista D1 sobre el entrenamiento en el LA.

La estimulación dopaminérgica es una herramienta farmacológica, que se utiliza para *modular la formación de la memoria* a largo plazo. La administración del agonista D1 SKF38393 en la corteza auditiva, recupera la memoria de discriminación de sonidos cuando ésta se afecta al bloquear ese mismo tipo de receptores, contrarrestando el daño causado (Schicknick et al., 2012). Además, la actividad de la dopamina requiere de otros sistemas de neurotransmisión, ya que sólo cuando existe una co-activación del receptor dopaminérgico y de los receptores glutamatérgicos NMDA y/o AMPA en núcleo accumbens, se lleva a cabo la consolidación de la memoria espacial de objetos en un contexto (Ferretti et

al., 2005), lo que fortalece la hipótesis de la participación de la dopamina como *modulador* de la memoria.

Los resultados obtenidos, orientados hacia la mejora del desempeño conductual por medio de la estimulación dopaminérgica, indican que la administración del agonista dopaminérgico mejora el desempeño conductual de los animales de 9m a partir del segundo día de entrenamiento, que es cuando los animales de 9m sin dicha estimulación, muestran la mayor diferencia con respecto a los demás grupos. De tal manera que incluso durante el entrenamiento, la estimulación sistémica (intraperitoneal i.p.) de los receptores dopaminérgicos D1, revierte el déficit cognitivo que los animales de 9m tienen durante los primeros días del entrenamiento en el LA.

En apoyo a estos resultados, se ha demostrado en trabajos previos, que este mismo fármaco también tiene un efecto positivo sobre la ejecución de algunas tareas cognitivas, particularmente en tareas espaciales, mejorando la ejecución de animales viejos de entre 18 y 20 meses, en el laberinto acuático de Barnes (Bach et al 1999; Hollinger, 2003). Además, este fármaco también tiene efecto en animales jóvenes con un entrenamiento muy corto, a los que se les administró de manera intra-hipocampal. Provocando una mejor ejecución durante la MLP en el LA (da Silva et al., 2012). A diferencia de este trabajo, y al haber aplicado de manera sistémica el fármaco, el presente trabajo muestra que el efecto de la administración de SKF38393, es más visible en animales de 9m con un entrenamiento prolongado, y no tiene efectos positivos sobre la consolidación de la memoria del entrenamiento corto; sugiriendo a la DA como modulador de la memoria espacial a largo plazo en cuando el entrenamiento es lo suficientemente largo para su consolidación.

Efecto de la administración de un agonista dopaminérgico D1 en la memoria espacial a largo plazo.

La potenciación de las capacidades cognitivas en animales jóvenes, es posible por medio de sobre entrenamiento (Ramírez-Amaya et al., 1999), por exposición a un ambiente enriquecido (Moser et al., 1994 y 1997) o por medio de la estimulación de receptores D1 (da Silva et al., 2012; Rossato et al., 2009).

Nuestro resultados nos indican que la estimulación dopaminérgica a través del receptor D1, además de tener un efecto positivo en animales de edad avanzada durante el entrenamiento en el LA, tiene también un efecto positivo en su desempeño durante la memoria a largo plazo del entrenamiento prolongado. Ya que, en conjunto con el entrenamiento, la estimulación del receptor D1 a través de su agonista SKF38393, potencia la consolidación de la MLP que podemos ver reflejada en una menor latencia para llegar a la plataforma y en un mayor número de cruces por el área de dicha plataforma.

En trabajos preliminares del laboratorio, el SKF i.p., aplicado en un modelo 3xTg-AD, tiene efectos sobre la neofobia⁸, ya que por el curso de la enfermedad los animales tienden a no presentarla ante un nuevo sabor como la sacarina. Además, reportes previos indican que existe una pérdida progresiva en la capacidad de mantener la potenciación a muy largo plazo (L-LTP) *in vitro* en la región hipocampal CA1. Además de un déficit progresivo en la memoria espacial a largo plazo en el laberinto circular de Barnes⁹; ambas asociadas a la edad y al proceso de envejecimiento (en un estudio con animales de 3, 6, 12, 18 meses). Dichos déficits conductuales y fisiológicos pueden ser atenuados con una dosis de 6mg/Kg i.p. del agonista dopaminérgico SKF38393 (Bach et al., 1999). Además, la misma dosis de este agonista D1 puede inducir una potenciación sináptica a muy largo plazo (L-LTP) en la misma región hipocampal, incluso por más de 6 horas *in*

⁸ La neofobia es el rechazo innato a probar alimentos nuevos que pueden tener un efecto dañino al organismo.

⁹ El Laberinto circular de Barnes permite evaluar la memoria espacial de roedores en situación de estrés. Consiste en una tabla circular con agujeros ubicados cerca del borde, alrededor del laberinto hay pistas visuales que le sirven al animal como claves espaciales. Sobre la tabla se coloca una luz brillante, lo que conducirá al animal a buscar un escape, que es una caja que se encuentra debajo de sólo uno de los círculos. De tal manera que el animal debe aprender la ubicación de dicha caja de escape.

vitro, mientras que de manera contraria, el antagonista SCH23390 evita la dicha potenciación cuando se aplican simultáneamente (Huang & Kandel, 1995). Actualmente, existen evidencias de que los efectos conductuales positivos derivados de la estimulación dopaminérgica D1, incrementan la respuesta en algunas cascadas de señalización intracelular, con relevancia durante la formación de la memoria, como *pERK1/2*, principalmente en zonas de relevancia conductual como corteza pre-frontal, así como *mTOR* en corteza auditiva (Nagai et al., 2007; Schicknick et al., 2008). De igual manera, la manutención del L-LTP, mecanismo modelo para estudiar la memoria a largo plazo, en hipocampo, requiere de la presencia de dopamina (Lisman & Grace 2005).

Uno de los puntos principales de este trabajo es evaluar la importancia de la dopamina durante el proceso de envejecimiento. En trabajos previos, se ha demostrado que existe una pérdida de los marcadores dopaminérgicos, que se da de manera progresiva con la edad, entre los que destacan, el receptor dopaminérgico de tipo 1 (D1) (Bäckman et al., 2006). De tal manera que se ha observado una disminución del potencial de unión de los receptores D1 a su ligando, por medio de tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) con el radioligando [11C] SCH23390; principalmente en zonas como la corteza cingulada, la corteza prefrontal dorsolateral y la corteza parietal (Suhara et al., 1991; MacDonald et al., 2012). Además se ha visto que ratas macho de 17 meses, pierden fibras reactivas a tirosina hidroxilasa en corteza prefrontal, fibras que se encuentran mayormente relacionadas con la transmisión dopaminérgica en dicha área (Chisholm et al., 2013). Aunado a estos hallazgos, existe una correlación directamente proporcional entre el déficit en la memoria de trabajo espacial y la disminución de fibras inmunoreactivas a TH, así como con una disminución en su actividad de producción de L-DOPA, precursor de dopamina en CPF (Mizoguchi et al., 2009).

Estos hallazgos indican que la actividad dopaminérgica se va perdiendo gradualmente con la edad. Por ello se han desarrollado hipótesis para mejorar la calidad de vida de los adultos mayores humanos, potenciando la consolidación de las memorias episódicas, que van perdiendo gradualmente, por medio de la estimulación dopaminérgica. Por ejemplo, la aplicación sistémica de L-DOPA en

adultos mayores, produce una mejora en el desempeño de tareas como el aprendizaje por recompensa basado en la experiencia, mismo que requiere de toma de decisiones (Shohamy & Wimmer's, 2013); además se observa la mejora en tareas de reconocimiento de imágenes, que es una parte fundamental de la memoria episódica, el primer tipo de memoria que se afecta durante el proceso de envejecimiento (Chowdhury et al., 2012).

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la estimulación dopaminérgica puede generar mejoras cognitivas, particularmente de manera sistémica, ya que se sabe que algunos agonistas D1, entre ellos el SKF38393, pueden atravesar la barrera hematoencefálica (Kamien & Woolverton, 1985) de igual manera que algunos fármacos precursores de DA como L-DOPA (Shohamy & Wimmer's, 2013; Chowdhury et al., 2012).

Las mejoras conductuales derivadas de la aplicación de agonistas o precursores dopaminérgicos, incluyendo nuestros resultados, tienen una base fisiológica relacionada con la actividad dopaminérgica en zonas de relevancia mnemónica. Se ha reportado que la liberación de dopamina en las terminales del área tegmental ventral (VTA)- giro dentado, sumada a la actividad de alta frecuencia, incrementa la probabilidad de fortalecer dichas sinapsis en la formación de memorias espaciales de recompensa (Hamilton et al., 2010). Además se ha observado que los receptores dopaminérgicos del tipo 1, modulan la formación de sinapsis persistentes y la formación de memorias dependientes de hipocampo (Revisado en Hansen & Manahan-Vaughan 2012). Lo anterior podría estar sustentado por una hipótesis propuesta por Lisman y Grace (2005), por medio de un *loop funcional* entre el hipocampo y las neuronas del VTA (área caracterizada por la presencia de neuronas dopaminérgicas que proyectan a distintas áreas cerebrales). Este loop funcional (sobre la consolidación de la memoria) inicia con la entrada de información nueva a través de subículo, núcleo acumbens y núcleo pálido hacia el VTA, a partir de ahí hay liberación de dopamina hacia el hipocampo, en donde produciría el mantenimiento del LTP y de la memoria. De manera general, este loop funcionaría regulando la entrada de información para la formación de nuevas memorias.

CONCLUSIONES

El entrenamiento prolongado da como resultado que, tanto animales jóvenes (4 meses), como de edad avanzada (9 meses), lleguen a una *asíntota de aprendizaje* a partir del quinto día de entrenamiento, por lo tanto, los animales son capaces de adquirir la tarea a ambas edades.

Pese a que los animales de 9m adquieren la tarea, la MLP se ve afectada por la edad, sin importar que los animales hayan sido sobre entrenados.

El efecto de la edad en la MLP se puede atenuar estimulando el sistema dopaminérgico por medio de los receptores D1 de manera sistémica en conjunto con el entrenamiento prolongado.

LITERATURA CITADA

Aggleton, J., & Brown, M. 1999. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis, *Behavioral and brain sciences*, 22: 425- 489.

Anderson, J. 1995. *Learning and memory, an integrated approach*, John Wiley Sons Ed., USA; pp. 7-8.

Bach, M., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y-F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins., Kandel, E.R. 1999, Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5280- 5285.

Bäckman, L., Nyberg, L., Lindenberger, U., Li, SC., Farde, L. The correlative triad among aging, dopamine and cognition: current status and future prospects. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30: 791- 807.

Balderas, I., Moreno-Castilla, P., Bermúdez-Rattoni, F. 2013. Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. *Hippocampus*, 23 (10): 873-878.

Barros, C., Ekuni, R., Moro, M., Pereira, F., Pereira, M., Milani, H. 2008. The cognitive and histopathological effects of chronic 4-vessel occlusion in rats depend on the set of vessels occluded and the age of the animals; *Behavioural Brain Research*, 197: 378-387.

Beaulieu, J-M. & Gainetdinov, R. 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63:182- 217.

Bennett, J., McRae, P., Levy, L., Frick, K. 2006. Long-term continuous but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice; *Neurobiology of learning and memory*, 85: 139- 152.

Bergado, J., Fernández, C., Gómez-Soria, A., González, O. 1997. Chronic intraventricular infusión with NGF improves LTP in old cognitively-impaired rats; *Brain research*, 770: 1- 9.

Bergado, J., & Almaguer, W. 2002. Aging and synaptic plasticity: a review; *Neural plasticity*, 9(4): 217- 232.

Bergado, J., Almaguer, W., Rojas, Y., Capdevilla, V., Frey, J. 2011. Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral-statistical analysis; *Neuroscience* 172: 256-269.

Brim, B.L., Haskell, R., Awedikian, R., Ellinwood, N.M., Jin, L., Kumar, A., Foster, T.C., Magnusson, K.R. 2013. Memory in aged mice is rescued by enhanced expression of the GluN2B subunit of the NMDA receptor, *Behavioural Brain Research* 238: 211- 226.

Buccafusco JJ, editor. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition. CRC Press; 2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5228/>

Buckner, R., Hughes, H. 2004. Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate, *Neuron*, 44: 195-208.

Carrillo-Mora, P. 2010. Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Segunda parte: Sistemas de memoria de largo plazo: Memoria episódica, sistemas de memoria no declarativa y memoria de trabajo; *Salud mental*, 33: 197- 205.

Carrillo Mora, P. 2010b. Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria a largo plazo- la memoria semántica, *Salud mental*, 33: 85- 93.

Charles Rivers Research Models 2011. CD-1 IGS Mice, Nomenclature: Crl: CD1(ICR). Charles River Laboratories International, Inc.

Chisholm, N., Kim, T., Juraska, J. 2013. Males, but not females, lose tyrosine hydroxylase fibers in the medial prefrontal cortex and are impaired on a delayed alternation task during aging. *Behavioural Brain Research*, 243: 239- 246.

CNS Forum, http://www.cnsforum.com/imagebank/item/D_struc_level2/default.aspx, fecha de consulta, Mayo 2013.

Compton, DM., Griffith, R., McDaniel, WF., Foster, RA., Davis, BK. 1997. The flexible use of multiple cue relationships in spatial navigation: A comparison of water maze performance following hippocampal, medial septal, prefrontal cortex, or posterior parietal cortex lesions; *Neurobiology of learning and memory*, 68: 117- 132. Artículo N° NL973793.

Dudai, Y. 2002. *Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond*, Ed. Oxford University Press; pp. 190- 192.

Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or how stable is the engram, *Annual Reviews Psychol.*, 55:51-86.

Escobar, M. & Derrick, B. Long-Term potentiation and depression as putative mechanisms for memory formation, in Bermúdez-Rattoni, F. 2007. *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging*; *Frontiers in neuroscience*, CRC press; pp. 15- 18.

Ferretti, V., Florian, C., Constantini, V., Rouillet, P., Rinaldi, A., De Leonibus, E., Oliverio, A., Mele, A. 2005. Co-activation of glutamate and dopamine receptors within the nucleus accumbens is required for spatial memory consolidation in mice. *Psychopharmacology* 179: 108- 116.

Foster, T., DeFazio, R., Bizon, J. 2012. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models; *Frontiers in aging neuroscience*, 4(12): 1- 18.

Frick, K., & Fernandez, S. 2003. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice; *Neurobiology of aging*, 24: 615- 626.

Fried, I., Wilson, C., Morrow, J., Cameron, K., Behnke, E., Ackerson, L., Maidment, N. Increased dopamine release in the human amygdala during performance of cognitive tasks, *Nature Neuroscience* 4 (2): 201-206.

Gangarossa G, Di Benedetto M, O'Sullivan GJ, Dunleavy M, Alcacer C, et al. 2011. Convulsant Doses of a Dopamine D1 Receptor Agonist Result in Erk-Dependent Increases in Zif268 and Arc/Arg3.1 Expression in Mouse Dentate Gyrus. *PLoS ONE* 6(5): e19415. doi:10.1371/journal.pone.0019415

Grady, C. y Craik, F. 2000. Changes in memory processing with age; *Current Opinion in Neurobiology*, 10(2): 224-231.

Haley, G., Kohama, S., Urbanski, H., Raber, J. 2010. Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2, apoE, and GFAP levels in the rhesus macaque prefrontal cortex and hippocampus; *Age*, 32: 283- 296.

Hollinger, M. 2003. *Introduction to pharmacology*, 2nd ed. Taylor & Francis Group, pp 44, 90- 101.

Jay, T.M. 2003. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms; *Progress in neurobiology*, 69: 375- 390.

Li, L., Ding, J., Marshall, C., Gao, J., Hu, G., Xiao, M. 2011. Pretraining affects Morris water maze performance with different patterns between control and ovariectomized plus D-galactose-injected mice. *Behavioural Brain Research*, 217: 244-247.

Kamien, J. & Woolverton, W. 1985. The D1 dopamine agonist SKF38393 functions as a discriminative stimulus in rats. *Psychopharmacology* 87: 368- 370.

Kapsimali, M., LeCrom, S., Vernier, P. 2003. A natural history of vertebrate dopamine receptors, in *Dopamine receptors and transporters, fuction, imaging and clinical implication*, edited by Sidhu, A., Laruelle, M., Vernier, P. Marcel Dekker, Inc, 2nd ed.

Keeley, R., Wartman, B., Häusler, A., Holahan, M. 2010. Effect of juvenile pretraining on adolescent structural hippocampal attributes as a substrate for enhanced spatial performance. *Learning and memory*, 17: 344- 354.

Kempermann, G., Brandon, E., Gage, F. 1998. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Current biology* 8: 939- 942.

Liu, P. & Bilkey, DK. 1998. Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze. *Behav Neuroscience*, 112 (2): 304- 315.

MacDonald, S., Karlsson, S., Rieckmann, A., Nyberg, L., Bäckman, L. 2012. Aging-related increases in behavioral variability: relations to losses of dopamine D1 receptors. *The Journal of Neuroscience*, 32(24):8186- 8191.

Mansouri, MT., Naghizadeh, B., López-Larrubia, P., Cauli, O. 2013. Behavioral deficits induced by lead exposure are accompanied by serotonergic and cholinergic alterations in the prefrontal cortex. *Neurochem Int.* 62 (3): 232- 239.

McGaugh, J. 2000. Memory, a century of consolidation, *Science* 287: 248-251.

Milner, B., Squire, L., Kandel, E. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory; *Neuron*, 20: 445- 468.

Miyoshi, E., Wietzikoski, EC., Bortolanza, M., Boschen, SL., Canteras, NS., Izquierdo, I., Da Cunha, C. 2012. Both the dorsal hippocampus and the dorsolateral striatum are needed for rat navigation in the Morris water maze; *Behavioural brain research*, 226 (1): 171. 178.

Mizoguchi, K., Shoji, H., Tanaka, Y., Maruyama, Tabira, T. 2009. Age-related spatial working memory impairment is caused by prefrontal cortical dopaminergic dysfunction in rats. *Neuroscience* 162: 1192- 1201.

Morris, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat; *Journal of Neuroscience Methods*, 11:47-60.

Moser, MB., Trommald, M., Andersen, P. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12673- 12675.

Moser, MB., Trommald, M., Egeland, T., Andersen, P. 1997. Spatial training in a complex environment and isolation alter the spine distribution differently in rat CA1 pyramidal cells. *The journal of comparative neurology*, 380: 373-381.

Muñoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I., Segura-Aguilar, J. 2012. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinson's Disease* 2012: 920953.

Nagai, T., Takuma, K., Kamei, H., Ito, Y., Nakamichi, N., Ibi, D., Nakanishi, Y., Murai, M., Mizoguchi, H., Nabeshima, T., Yamada, K. 2007. Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex, *Learning & Memory* 14:117-125.

Oddo, S., Caccamo, S., Shepherd, J., Murphy, M., Golde, T., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M., Akbari, Y & LaFerla, F. 2003. Triple-Transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular AB and synaptic dysfunction. *Neuron*, Vol. 39, 409-421.

Ramírez-Amaya, V., Escobar, M., Chao, V., Bermúdez-Rattoni, F. 1999. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining, *Hippocampus* 9: 631- 636.

Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M., Bermúdez-Rattoni, F. 2001. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis, *The journal of neuroscience* 21 (18): 7340- 7348.

Rossato, J., Bevilaqua, L., Izquierdo, I., Medina, J., Cammarota, M. 2009. Dopamine controls persistence of Long-Term Memory storage; *Science* 325: 1017- 1020.

Santín, L.J., Rubio, S., Begega, A., Miranda, R., Arias, J.L. 2000. Aprendizaje especial e hipocampo. *Rev. Neurol* 31: 455- 462.

Schicknick, H., Schott, B., Budinger, E., Smalla K-H., Riedel, A., Seidenbecher, C., Scheich, H., Gundelfinger, E., Tischmeyer, W. 2008. Dopaminergic modulation of auditory cortex-dependent memory consolidation through mTOR. *Cerebral Cortex*, 18: 2646-2658.

Siegel, George J., Albers, Wayne R., Brady, Scott T., Price, Donald L., 2006. *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, Elsevier Academic Press 7th ed, pp 859.

da **Silva**, W., Köhler, C., Radiske, A., Cammarota, M. 2012. D₁/D₅ dopamine receptors modulate spatial memory formation; *Neurobiology of learning and memory* 97: 271- 275.

Simpson, J. & Kelly, J. 2011. The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects. *Behavioural brain research*, 222: 246- 264.

Squire, Larry R, 1987. *Memory and brain*, Oxford University Press. NY, pp 3.

Suhara, T., Fukuda, H., Inoue, O., Suzuki, K., Yamasaki, T., Tateno, Y. 1991. Age-related-changes in human D1-dopamine receptors measured by positron emission tomography. *Psychopharmacology* 103: 41- 45.

Tevi, M.F., Giebultowicz, J., Pincus, Z., Mazzoccoli, G., Vinciguerra, M. 2012. Aging signaling pathways and circadian clock-dependent metabolic derangements, *Trends in endocrinology and metabolism*, 1-9. TEM doi:10.1016/j.tem.2012.12.002

Thompson, R. 2000. *The brain: a neuroscience primer*, Worth Publishers 3th ed., New York.

Trimble, W. & Scheller, R. 1988. Molecular biology of synaptic vesicle-associated proteins, *Trends in neurosciences*, 11 (6): 241- 242.

UCLA Behavioral Testing Core Facility; recurso electrónico <http://btc.bol.ucla.edu/mwm.htm>; fecha de consulta 21 de Enero, 2013.

Vicens, P., Bernal, M., Carrasco., Redolat, R. 1999. Previous training in the water maze: differential effects in NMRI and C57BL mice, *Physiology & Behavior* 67 (2): 197- 203.

Vicens, P., Redolat., R., Carrasco, M. 2002. Effects of early spatial training on water maze performance: a longitudinal study in mice; *Experimental Gerontology*, 37: 575-581.

Vicens, P., Redolat, R. & Carrasco, M. 2003. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones; *Psicothema*, 15 (4): 539-544.

Villa, R.F., Ferrari, F., Gorini, A. 2012. Energy metabolism of rat cerebral cortex hypothalamus and hypophysis during ageing, *Neuroscience*, 227: 55-66.

Voller, J., Donek, A., Cendelín, J., Korelusová, I., Vozeh, F. 2008. The effect of D1-like receptor blockade on motor functions and spatial learning in B6CBA mice; *Prague medical report* 109 (1): 32-39.

Xiang, GQ., Tang, SS., Jiang, LY., Hong, H., Li, Q., Wang, C., Wang, XY., Zhang, TT., Yin, L. PPAR γ agonist pioglitazone improves scopolamine-induced memory impairment in mice. *J. Pharm Pharmacol*, 64 (4): 589- 596.

Xing, B., Kong, H., Meng, X., Wei., G., Xu, M., Li, S. 2010. Dopamine but D1 not D3 receptor is critical for spatial learning and related signaling in the hippocampus, *Neuroscience* 169: 1511- 1519.

Xing, B., Guo, J., Meng, X., Wei, SG., Li, SB. 2012. The dopamine D1 but not D3 receptor plays a fundamental role in spatial working memory and BDNF expression in prefrontal cortex of mice. *Behav Brain Research*, 235 (1): 36- 41.

Yu, Y.F., Zhai, F., Dai, C.F., Hu, J.J. 2011. The relationship between age-related hearing loss and synaptic changes in the hippocampus of C57BL/6J mice. *Experimental Gerontology*, 46 (9): 716-722.