



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**COMPORTAMIENTO DE LA MEMORIA VISUOESPACIAL
POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE PKA EN RATAS CON
SÍNDROME METABÓLICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

ADRIÁN LÓPEZ FERNÁNDEZ



**Facultad
de Psicología**

DIRECTOR DE TESIS: DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ

REVISOR: DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ

MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. David Erasmo García Díaz. Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave del proyecto IN215813). Agradezco a la DGAPA-PAPIIT-UNAM la beca recibida.

Reconocimientos

Agradezco al Dr. David E. García Díaz por toda su enseñanza, tiempo, dedicación y comentarios que permitieron cumplir con éxito este trabajo de Tesis. Sin su apoyo en todo momento, nada de esto hubiera podido realizarse.

Gracias a la Dra. Marina Martínez Vargas, de la Facultad de Medicina, por toda su ayuda, su valiosa enseñanza e imponderable disposición en las cirugías estereotáxicas, perfusiones, extracciones de cerebro y pruebas moleculares realizados para este trabajo.

Muchas gracias a la Dra. María De La Luz Navarro Angulo y la Dra. Leticia Verdugo Díaz de la Facultad de Medicina, por su contribución en las mediciones de presión arterial de los animales; a la Dra. Irma Zarco Padrón, de la Facultad de Medicina, al proporcionar ratas para algunos de los experimentos del presente trabajo. Se reconoce la colaboración del Dr. David Elías Viñas, el Ing. Esteban Ruíz y la Ing. J. Aime Salazar Anguiano, del Departamento de Ingeniería Eléctrica Sede Zacatenco de CINVESTAV, que proporcionaron el equipo para las mediciones de bioimpedancia.

Muchas gracias a Guillermo Luna por la construcción del laberinto utilizado en este trabajo, el cuarto experimental y en general, por su invaluable disposición para ayudar en cualquier momento. Gracias también, al Ing. Amado García por el generador de ruido blanco y a Gabino Borgonio Pérez por su colaboración en la medición de triglicéridos. Se agradece a Luis Martínez, auxiliar de laboratorio, por la limpieza del material de laboratorio, así como del cuidado en general de los animales. Se reconoce al Dr. Enrique Pinzón Estrada, Jefe del Bioterio de la Facultad de Medicina, por proporcionar los roedores utilizados en este trabajo.

Muchas gracias al Dr. Jorge Bravo Martínez y a la Bióloga Isabel Arenas, de la Facultad de Medicina, por su asesoría técnica y ayuda en los experimentos; al Dr. Víctor Rodríguez por su incuestionable enseñanza y asesoría.

Finalmente, agradezco a la Dra. Martha L. Escobar y a mis sinodales la Dra. Alejandra Ruíz, la Lic. Katia Rodríguez y el Dr. Fernando Peña, por su tiempo y especial atención a la revisión de mi trabajo, por sus valiosas correcciones y destacados comentarios realizados para mejorar la calidad de este trabajo.

Agradecimientos

A mis padres. Jamás alcanzaré mi vida para agradecer todo lo que han hecho por mí, esta Tesis y este triunfo es también de y para ustedes. Gracias por toda su paciencia, su enseñanza, sus regaños y apapachos. Por acompañarme en las buenas y en las malas. Ustedes son las personas más importantes de mi vida, los amo. A mi papá, Gabriel, por enseñarme que nunca hay que darse por vencidos sin importar las adversidades, porque gracias a ti reconozco hoy, que al final lo más importante es siempre ser un buen ser humano y nunca dejar de sonreír, estandartes que he adoptado para alcanzar mi felicidad. Eres grande “carnal”, eres mi inspiración; a mi mamá, Irma, porque gracias a ti soy lo que soy, por guiarme durante toda mi vida y motivarme a crecer día a día, porque sin tu apoyo incondicional no podría haber logrado nada, por transmitirme tanta sabiduría y experiencia, por todos los regaños que no hicieron más que levantarme y querer más. Porque me has dado las más grandes lecciones de vida y enseñarme que “orgullo” es una actitud que separa la excelencia de la mediocridad. Tú eres mi orgullo y mi más grande ejemplo de vida.

Gracias a Ludmilla, por ser la más maravillosa casualidad de mi vida. Sin ti no hubiera podido lograr esto. Gracias por tu apoyo, por tu comprensión, por tu cariño y por tu paciencia, por todo lo vivido y todo lo compartido; sobre todo muchas gracias por siempre dibujar una sonrisa para mí. Por enseñarme que todo es posible y motivarme cada día para superarme y lograr mis metas. Por mostrarme que los sueños son reales y se pueden compartir. Por ser mi amiga en todo momento y la compañera de toda mi vida. Gracias osita. Ich liebe dich bis zum Ende.

Gracias a mi familia “adoptiva”, a Gaby y Bruno por su invaluable apoyo y guía durante tanto tiempo. Por ayudarme a ser una mejor persona y por preocuparse siempre por mi bienestar. Los quiero mucho. De igual forma a mi familia grande por su directa o indirecta ayuda a lo largo de estos 24 años de formación académica y humana; a Adriana, y Chéncho, a Yola y Ale, a Bertha, Laura y Jaime. Al Güero y a mi abuelita Isabel por su cariño y por siempre estar al pendiente de mí. A todos y cada uno de mis primos por su alegría y por la admiración y respeto hacia mi persona, siempre ha sido clave. A mi abuelita “chiquita”, por hacerme valorar cada día de mi existencia. A mi abuelo Baltazar por ser el abuelo más necio, deportista y alegre de todos. Muy especialmente gracias a mi abuela Yolanda, por esperarme siempre en la noche después de la escuela cuando nadie más lo hacía, servirme un plato de comida caliente y platicar conmigo. Por ser tu consentido hasta el último día de tu vida. Esto también es para ti, abuela.

Gracias totales a mis compañeras de laboratorio durante estos años, tantas cosas aprendidas y experiencias vividas que, sin el trabajo de equipo, no se hubiera podido

tener éxito. A Kary por tus comentarios y opiniones tan valiosos y por siempre ser un ejemplo de trabajo duro para mí. A Celes por tu apoyo en los experimentos y tu risa inigualable. A Cinthya por el apoyo en el trabajo de laboratorio y por tantos momentos compartidos que permitieron quitarnos máscaras y sonreír.

Especial agradecimiento al Dr. David E. García por haberme permitido trabajar en su laboratorio, por todo su apoyo en la realización de este trabajo, así como por sus enseñanzas y conocimientos transmitidos. Sin duda una gran inspiración académica.

Gracias a todo el equipo de laboratorio; a Isa, Jorge, Julieta, Arturito, Liz, Héctor, Óscar, Anahí y Erika. Gracias por recibirme en el laboratorio con la mejor disposición de ayudar y hacerme sentir como en mi segunda casa. Se les estima mucho. Muchas gracias al señor Luis, por contagiar su alegría conmigo y siempre recibirme con una sonrisa. Gracias a la Dra. Marina por su tiempo y disposición para ayudarme siempre, valoro muchísimo su enseñanza. Gracias también al Dr. Víctor Rodríguez, por darme lecciones de que nada en la ciencia es lo que parece.

Gracias infinitas a mi alma mater, la Facultad de Psicología y a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de formarme, desarrollarme y crecer, no solo académicamente, sino personalmente también. Por enseñarme tantos valores universitarios y porque a donde quiera que sea mi destino siempre llevaré con orgullo los colores azul y oro de mi Universidad.

Gracias a mis amigos:

A la banda Prepa 6: A Toto, Víctor, Rox, Víctor (Barra), Bere, Danna, Ganzo, Kevin, Liz, Mario, Cheches, Mali, Chío. Su amistad ha sido y será siempre muy importante para mí. A los maricas y amigos entrañables de mi vida: Edgar (paulatino), Alejandro (Chuck), Octavio (Interpol), Chucho (Chuchín), Luis Jaime (Mosque). Hermanos por convicción propia, gracias por su apoyo y su amistad. Son personas que estoy seguro me acompañaran en más triunfos y experiencias.

A mis amigas hermosas y estimadas Carmen, Violeta, Ana y Angy. Amistades como las de ustedes quedan ya muy pocas, como la canción. Gracias por acompañarme más de 10 años en esta aventura. Estoy seguro que nuestra amistad perdurará por siempre, así lo quiero.

A mis pocos, pero las más valiosos, amigos de la Fac. A Ale (annoying) por tu amistad única e irreplicable. Eres desde ya, mi más grande amiga de la carrera y compartir todo lo que he vivido contigo me lo llevo por siempre. Te quiero feto-señor. Rebe, mi cuernachik favorita, gracias por todas las risas y momentos compartidos. Tu amistad me ha hecho muy feliz y tu alegría me la quedo como tu más grande tesoro. A Xóchitl (Xoxo) por siempre tener una actitud “ins-presionante” conmigo y

ante la vida. Valoro muchísimo tu amistad mollejas. Gracias a Phany por el tiempo y las experiencias vividas, siempre Unagi. Gracias a Haz (Rex), Luis (flies), May, Alita y Lau.

Gracias a todas las personas que la vida ha cruzado en mi camino, por todos los buenos momentos (los no tan buenos), las experiencias y el apoyo que me han compartido por tantos años. Muchas gracias a todos los que directa, pero sobre todo indirectamente, han contribuido en mi vida y han puesto un granito de arena para hacerme ser quien soy hoy.

“No es el crítico quien cuenta; ni aquellos que señalan como el hombre fuerte se tambalea, o en qué ocasiones el autor de los hechos podría haberlo hecho mejor. El reconocimiento pertenece realmente al hombre que está en la arena, con el rostro desfigurado por el polvo, sudor y sangre; al que se esfuerza valientemente, yerra y da un traspié tras otro pues no hay esfuerzo sin error o fallo; a aquel que realmente se empeña en lograr su cometido; quien conoce grandes entusiasmos, grandes devociones; quien se consagra a una causa digna; quien en el mejor de los casos encuentra al final el triunfo inherente al logro grandioso; y que en el peor de los casos, si fracasa, al menos caerá con la frente bien en alto, de manera que su lugar jamás estará entre aquellas almas frías y tímidas que no conocen ni la victoria ni el fracaso.”

The Man in the Arena

Theodore Roosevelt

ABREVIATURAS.....	8
Resumen.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. ANTECEDENTES.....	13
1) EL SÍNDROME METABÓLICO.....	13
2) MODELOS ANIMALES DEL SM.....	16
3) APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	18
3.1 Memoria de Trabajo.....	21
3.2 Memoria Visuoespacial.....	22
4) HIPOCAMPO / BASES MOLECULARES DE LA MEMORIA.....	24
5) VÍA DE PKA.....	29
6) PKA Y MEMORIA.....	32
7) SÍNDROME METABÓLICO Y SUS ALTERACIONES COGNITIVAS	40
8) PROTOCOLOS DE ESTUDIO DE LA MEMORIA VISUOESPACIAL.....	41
III. JUSTIFICACIÓN.....	44
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
V. HIPÓTESIS.....	46
VI. OBJETIVOS.....	47
VII. METODOLOGÍA.....	47
7.1 Sujetos.....	47
7.2 Dieta.....	48
7.3 Grupos Experimentales.....	48

7.4 Mediciones.....	49
7.5 Cirugía Estereotáxica.....	53
7.6 Administración/Microinyección.....	54
7.7 Histología.....	56
7.8 Evaluación de la memoria visuoespacial.....	57
a) Set Experimental.....	58
b) Protocolo.....	60
c) Mediciones.....	63
7.9 Análisis Estadístico.....	63
VIII. RESULTADOS.....	64
IX. DISCUSIÓN.....	91
X. CONCLUSIONES.....	107
XI. REFERENCIAS.....	108

Abreviaturas

(AMPc) Adenosín monofosfato cíclico

(ANSA) Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria

(ATP III) The National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III

(BF) Grasa Corporal (siglas en inglés)

(CREB) cAMP response element-binding

(dB-AMPc) Dibutiril AMP cíclico

(ECW) Agua Extracelular (siglas en inglés)

(FFM) Masa Libre de Grasa (siglas en inglés), agua extracelular

(ih) Intrahipocampal

(IMC) Índice de Masa Corporal

(LTP) Potenciación a Largo Plazo

(MLP) Memoria a Largo Plazo

(MV) Memoria Visuoespacial

(NMDA) N-Metil D-aspartato

(OMS) Organización Mundial de la Salud

(PKA) Proteína Cinasa dependiente de AMPc

(PTGI) Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

(SM) Síndrome Metabólico

(TBW) Agua Corporal Total (siglas en inglés)

(Tx) Animales tratados con dieta al 20% de sacarosa (p/v)

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones entre las cuales están la hipertensión, la dislipidemia, la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina. Además de que se asocia a procesos inflamatorios cerebrales. Lo anterior, representan un elevado factor de riesgo para el desarrollo de diversas patologías que pueden llegar a derivar en enfermedades cardiovasculares, en diabetes tipo II, en diversos tipos de cáncer y/o en cálculos biliares. En años recientes, se ha establecido que el SM no solo tiene impacto a nivel metabólico, sino que éste puede desencadenar una serie de alteraciones en procesos cerebrales que traen como resultado un deterioro cognitivo en funciones ejecutivas como la atención, la memoria y el aprendizaje (Yaffe, 2009; Frisardi, 2010).

La memoria visuoespacial es un tipo específicos de memoria dependiente de hipocampo, por lo que deficiencias pueden derivar en patologías que van desde problemas en el aprendizaje, hasta diferentes tipos de amnesia, lo que compromete la vida diaria de las personas que lo padecen (Gutiérrez-Guzmán, 2011). Diversas cascadas de señalización han sido relacionadas con el proceso de memoria, sin embargo la implicación de la vía de PKA en la memoria es ampliamente aceptada como mecanismo molecular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria. Evidencia experimental apoya la influencia que tienen inhibidores (Nijholt, 2008; Miskiw, 2010; Petri-Guerra, 2011; Assis Souza, 2012; Eftekhazadeh, 2012) y activadores (Sharifzadeh, 2007, 2010 y Petri-Guerra, 2011) del sistema de PKA en el comportamiento de la memoria visuoespacial. Sin embargo, no existen investigaciones que relacionen los cambios conductuales en la memoria visuoespacial con la activación del sistema de PKA ante una alteración metabólica inducida, en este caso el SM.

El objetivo de este trabajo fue identificar los cambios conductuales existentes en la memoria visuoespacial por la activación de la vía de la PKA en el hipocampo de ratas con SM inducido. Se empleó un modelo de inducción de SM con ratas macho de cepa Wistar de ocho semanas de edad (Larque, et. Al. 2011). Se midieron los parámetros metabólicos descritos por Grundy (2004). Estos criterios fueron; presión

arterial alta (igual o mayor a 125 / 91 mm Hg), niveles de glucosa (alteración en la cinética de la curva de tolerancia a la glucosa), nivel de triglicéridos (mayor a 150 mg/dL), índice de masa corporal (mayor porcentaje de grasa corporal) y peso de los sujetos (ganancia de más del 20% de su peso inicial). Por otro lado, se evaluó la memoria visuoespacial por medio del laberinto de Barnes (Barnes, 1979).

Respecto a los resultados observados en los parámetros metabólicos del grupo con dieta alta en carbohidratos, se obtuvieron incrementos en los niveles de triglicéridos, presión arterial, así como incremento en los niveles de glucosa en la prueba de tolerancia a la glucosa. Lo anterior comprobó la instalación del SM en los grupos con dieta alta en carbohidratos. Por otro lado, en la evaluación cognitiva de los grupos control y SM, se observó una alteración en la curva de aprendizaje tanto en el parámetro de errores (aumento en el promedio de número de errores) como en el de la latencia (aumento en el promedio de tiempo) respecto de los demás grupos, sin ser significativos. Además, en el grupo SM se observó un decremento en la evaluación de la memoria a largo plazo a 24 horas. Por el contrario, el grupo experimental SM+dB (sujetos con SM a los cuales se les aplicó dibutiril AMPc, activador de la vía de PKA), así como el grupo dB (sujetos a los cuales se les aplicó dibutiril AMPc), mostraron un mejoramiento de la memoria a 24 horas de la última aplicación del dB respecto de los controles, por lo que se podría sugerir cambios en tareas dependientes de hipocampo como consecuencia de la activación de la vía de PKA en sujetos que están comprometidos por el deterioro cognitivo causado por el SM.

Palabras clave

Síndrome metabólico, dieta alta en sacarosa, memoria visuoespacial, vía de PKA, deterioro cognitivo, laberinto de Barnes, memoria a largo plazo.

I. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es una patología caracterizada por diferentes alteraciones entre las cuales están la hipertensión (Kanazawa 2003; Larqué et. al., 2011), la dislipidemia (Larqué et. al., 2011), hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Grundy 2004; Larqué et. al., 2011), así como de procesos inflamatorios cerebrales (Grundy, 2004). Además, la prevalencia del SM ha incrementado a niveles preocupantes dentro de la población mundial y específicamente en México (OMS, 2012). Ésto, probablemente como consecuencia de un alto consumo de carbohidratos en combinación con un incremento en los índices de sedentarismo (Larqué et. al., 2011; Martínez, 2011).

Todos estos componentes del SM representan factores de riesgo para el desarrollo de patologías que resulten en complicaciones cardiovasculares, en diabetes mellitus tipo II, en diversos tipos de cáncer, y/o cálculos biliares (Yaffe, 2004, 2009; Grundy, 2004; Boden-Albala, 2007; Yates, 2012; Frisardi, 2010). En años recientes se ha establecido que el SM no solo tiene impacto a nivel metabólico (Grundy, 2004), sino que éste puede desencadenar una serie de alteraciones en procesos cerebrales que traen como resultado un deterioro cognitivo en funciones ejecutivas como la atención, la memoria y el aprendizaje (Yaffe, 2009; Frisardi, 2010). Además, el SM se ha correlacionado con la prevalencia de diferentes alteraciones neurológicas y/o psiquiátricas, como la Enfermedad de Alzheimer o la depresión (Bourin, 2005; Heiskanen, 2006; Kozumplik, 2011).

Dentro de las funciones ejecutivas afectadas por el SM se encuentra el aprendizaje, que se define como la modificación de la conducta por medio de la experiencia (Kandel, 1997). Este proceso está relacionado con varios subtipos de memoria (capacidad para codificar, almacenar y recuperar información del pasado) como lo son la memoria de trabajo y la memoria visuoespacial. La memoria de trabajo se refiere a la recuperación de la información que se requiere para realizar una tarea inmediata, y está localizada en el lóbulo frontal (Baddeley, 2003, 2012; Dash 2011), mientras que la memoria visuoespacial es un proceso de recuperación de la información para ubicarnos, orientarnos y desplazarnos espacialmente en un

entorno por medio de claves visuales, lo que permite reconocer el contexto y ambiente en el que se encuentra (Xavier, 2009). Ésta se localiza en el área CA1 del hipocampo (Gutiérrez-Guzmán, 2011; Khorshidahmad, 2012).

La proteína cinasa A (PKA) juega un papel clave en procesos biológicos y cognitivos diversos, como la memoria, mediante la fosforilación de proteínas (Abel, 1997, 2008). La implicación de la vía de PKA en la memoria ha sido tema de estudio durante décadas, pero fue Eric Kandel quien propuso un modelo que hoy en día resulta ser fundamental en el estudio de la memoria y sus bases moleculares (Kandel, 1989). Los experimentos de Kandel, utilizando a la *Aplysia californica* como modelo, establecen un mecanismo molecular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria. Este mecanismo es el sistema de PKA dependiente de fosforilación, cuya participación en procesos cognitivos como la memoria ha mostrado que dicho sistema tiene un papel específico en las fases finales de la consolidación de la memoria, la cual requiere específicamente de la síntesis de nuevas proteínas (Petri-Guerra, et al. 2011). Además, Abel y colaboradores realizaron una revisión que describe los estudios respectivos a esta relación y encuentran en investigaciones con ratones transgénicos (ratones a los que se les expresó el dominio negativo de la subunidad reguladora de PKA) que ocurre una activación de la PKA después de una fase de entrenamiento en el laberinto de Morris. Asimismo, hay estudios que muestran una mayor actividad de PKA después del entrenamiento en el laberinto radial y el laberinto de Morris (Sharifzadeh, 2007, 2010; Petri-Guerra, 2011; Vázquez, 2000). Sin embargo, no existen investigaciones que relacionen los cambios conductuales en la memoria visuoespacial con la activación de la vía de PKA ante una alteración metabólica inducida, en este caso el SM. No se conoce hasta el momento si la activación persistente de la vía de PKA pudiera traer algún cambio conductual en sujetos que tengan instalado el SM; más aún, de qué manera afectaría su desempeño en una tarea de memoria visuoespacial. Esto permitirá establecer el papel específico que tiene PKA y sus procesos intrínsecos como la fosforilación, la señalización y/o su activación en tareas dependientes de hipocampo en roedores.

Por lo anterior, este trabajo tiene como propósito identificar los cambios conductuales en la memoria visuoespacial como consecuencia de una activación de la vía de PKA en la región CA1 del hipocampo de ratas que cursan con SM inducido.

Se utilizó el protocolo de Barnes para evaluar el aprendizaje, la memoria visuoespacial y la memoria largo plazo a 24 horas y 5 días.

II. ANTECEDENTES

1. *El síndrome metabólico*

El SM se caracteriza por un conjunto de alteraciones metabólicas que predisponen y comprometen la salud del individuo que lo padece, además de que incrementa el riesgo de desarrollar otras patologías o enfermedades (Grundy, 2004). Este síndrome ha sido ampliamente estudiado tanto en humanos como en modelos animales. No obstante, no se conocen con detalle los cambios a nivel molecular, celular y/o conductuales que suceden durante su establecimiento. Fue descrito por primera vez en 1983 por Reaven como Síndrome X y caracterizado como la agrupación de diferentes alteraciones metabólicas como la intolerancia a la glucosa, hipertensión, hipertrigliceridemia y disminución del colesterol de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés), y que éstas tendían a manifestarse en conjunto. A lo largo de su estudio, el SM ha sido nombrado de diversas formas por los diferentes grupos de trabajo y asociaciones que se han dedicado a estudiarlo. Entre las definiciones que destacan se encuentra “síndrome de resistencia a la insulina”, “síndrome plurimetabólico”, “cuarteto de la muerte”, “síndrome dismetabólico cardiovascular”, hasta llegar a la definición actual (Síndrome metabólico) que es reconocida a nivel mundial por la comunidad científica y que fue propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Consenso Mexicano sobre el Tratamiento Integral del Síndrome Metabólico, 2002).

Han existido diversos criterios que catalogan la instalación del síndrome metabólico, sin embargo, uno de los más aceptados por las asociaciones internacionales en pro

de la salud es el propuesto por “The National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III” (ATP III, por sus siglas en inglés). La ATP III propone las siguientes características, estableciendo que la prevalencia de 3 o más signos/síntomas es diagnosticado como SM (Grundy et al., 2004). Estos criterios son:

- *Obesidad abdominal*: exceso de masa grasa (porcentaje de masa corporal mayor a 25% en hombres y mayor a 33% en las mujeres) perjudicial para la salud.
- *Dislipidemia*: concentraciones anormales de lipoproteínas sanguíneas (elevación de los triglicéridos asociada a una disminución del colesterol HDL). Su sustrato fisiopatológico es un aumento en el flujo de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo hacia el hígado como consecuencia de la resistencia insulínica periférica, lo que conlleva a una mayor síntesis de triglicéridos y un aumento en la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad.
- *Presión arterial elevada*: afección caracterizada por una elevación crónica de la presión arterial, usualmente por encima de 140/90 mm Hg.
- *Resistencia a la insulina / Hiperinsulinemia*: concentración elevada de insulina en el plasma sanguíneo. La resistencia a la insulina se define como una condición en la cual las cantidades de insulina producidas fisiológicamente producen una respuesta biológica reducida. Tras la resistencia a la insulina aparece una hiperinsulinemia compensadora, demostrado con el hallazgo de elevadas concentraciones de insulina en ayuno y después de las comidas.
- *Estado proinflamatorio*: es una elevación de la proteína C reactiva. La obesidad parece ser una de las principales causas de esta anormalidad, debido a que el exceso de tejido adiposo libera citocinas que pueden suscitar mayores niveles de la proteína C reactiva.
- *Estado protrombótico*: caracterizado por un incremento en el plasma del fibrinógeno PAI-1 (factor inhibidor de la activación del plasminógeno-1). Reacciona a altos niveles de citocinas como en el estado proinflamatorio. Es por eso que el estado protrombótico y el proinflamatorio podrían estar metabólicamente interconectados.

Estos componentes constituyen los principales factores de riesgo para desarrollar SM. Asimismo, múltiples factores están implicados en la incidencia del SM, y pueden ser de carácter ambiental o genéticos; la dieta, la actividad física, el género, la edad y el origen étnico son algunos componentes que pueden influir en el proceso de instalación. La tabla 1 resume los criterios antes descritos.

Factor	Criterio*
1	Cintura > 88 cm (mujeres) o > 102 cm (hombres)
2	HDL-C < 50 mg/dl (mujeres) o < 40 mg/dl (hombres)
3	Triglicéridos en ayuno > 150 mg/dl (1,69 nmol/L)
4	Presión sanguínea > 130/85 mmHg
5	Glucosa en ayuno > 110 mg/dl (>6,1 mmol/L)

Tabla 1. Criterios diagnósticos del SM según la ATP III. El diagnóstico requiere la presencia de 3 o más de estos criterios.

No se conoce la causa principal para el desarrollo de esta alteración, sin embargo, se ha sugerido que el sobrepeso y la obesidad, además de cambios hormonales, principalmente en niveles de insulina y la edad, pueden contribuir de manera importante al desarrollo de la misma (Grundy, 2004). En años recientes la prevalencia del SM ha incrementado a niveles preocupantes dentro de la población mundial y específicamente en México (OMS, 2012), donde actualmente cerca de 70 millones de personas padecen obesidad, complicando su salud e incrementando la probabilidad de incidencia uno o varios componentes del SM, comprometiendo su bienestar y plenitud física y mental. Lo anterior probablemente como consecuencia de un alto consumo en carbohidratos en combinación con un incremento en los

índices de sedentarismo (Larqué et. al. et. al., 2011 y Martínez, 2011). Además, tanto la causa de mortalidad global como la de mortalidad cardiovascular son mayores en los pacientes que tienen síndrome metabólico en comparación con los que no lo presentan (Levine, 2010).

Con base en lo anterior se establece que dietas hipercalóricas, acompañadas de baja actividad física pueden provocar SM (Larqué et. al. et. al, 2011 y Martínez, 2011).

2. Modelos Animales del SM

En investigación, los modelos animales permiten una aproximación científica a diversos procesos patológicos que son muy similares a los que ocurren en el humano, así pues múltiples patologías o enfermedades han sido complementariamente estudiadas a lo largo de la historia desde modelos animales que han ayudado a investigar su origen, incidencia, prevalencia, e incluso dos de los focos más importantes en recientes años dentro de la literatura científica como lo son la prevención y/o erradicación de enfermedades.

El SM es también una patología reproducible en modelos animales con roedores que tiene como objetivo ampliar su estudio y conocer más acerca de su fisiopatología, consecuencias, tratamiento e implicaciones existentes en esta enfermedad. Particularmente en la investigación con roedores existen varios modelos que se utilizan para inducir el SM. Larqué et. al. en el 2011, realizan una revisión de diversos modelos en roedores que se han utilizado para estudiar el SM entre los que destacan el modelo de ratones ob/ob (OM, por sus siglas en inglés), los cuales tienen una deficiencia de leptina funcional y que además son hiperfágicos, obesos, y muestran intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. En esta misma revisión, Larqué et. al. menciona otros modelos que también se caracterizan por deficiencia en el receptor de leptina como los ratones db/db y las ratas fa/fa. Por otro lado también existen modelos genéticamente modificados en los que se han observado intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.

La dieta tiene un papel importante para definir el equilibrio metabólico del organismo por lo que se han desarrollado aproximaciones alterando el insumo de carbohidratos, azúcar y/o grasa que se proporciona a las ratas para generar SM (Avena, 2009, Larqué et. al., 2011).

Los cambios fisiológicos observados por las dietas altas en grasas dependen de la cantidad y tipo de grasa que se proporcione en cada experimento. Habitualmente la cantidad de grasa proporcionada oscila entre el 30 y 60%, y proviene de diferentes fuentes de grasas como la manteca de cerdo, aceite de soya, de oliva o de pescado, grasa de coco o mantequilla (Larqué et. al. *et al*, 2011). Larqué et. al. en el 2011 mostraron que las ratas con SM presentan un incremento en los niveles de triglicéridos y colesterol; conjuntamente muestran un aumento en la presión arterial sistólica, así como el aumento en los niveles de glucosa e insulina, tienen alteraciones de la frecuencia cardiaca, muestran una degradación más lenta de acuerdo con la curva de tolerancia a la glucosa, aumentan su peso corporal y tejido adiposo, además de tener hígado graso. También existen modelos desarrollados con la inducción del SM por medio de una ingesta alta en fructuosa. Esta dieta está compuesta de 60-80% de fructuosa en combinación de un compuesto de proteína (10-20%) y 5% de grasa, y es disuelta en agua (Larqué et. al., *et al*, 2011).

Aunado a lo anterior, es preocupante que la incidencia del SM ha ido en aumento en los últimos años, específicamente en México, donde los altos índices de prevalencia del SM son cada vez más alarmantes y constituye sin duda, uno de los principales y más graves problemas de salud en el país, debido a la incidencia y las consecuencias que éste trae consigo, tanto metabólicas, como cognitivas. (ANSA, 2010). Diversos estudios de tipo prospectivo con poblaciones humanas han reportado la incidencia y relación existente entre el SM y el mal desempeño en tareas cognitivas (Yaffe, 2004 y 2009; Frisardi, 2010; Yates, 2012). Además, otros grupos de trabajo han correlacionado la ocurrencia del SM con otras patologías que predisponen al organismo que cursa con este padecimiento a desarrollar otras afecciones como la diabetes mellitus tipo II, diversos tipos de cáncer, cálculos biliares, demencia, depresión o enfermedades cardiovasculares (Yaffe, 2004;

Grundy, 2004; Heiskanen, 2006; Boden-Albala, 2007; Yates, 2012; Frisardi, 2010; Kozumplik, 2011). Una posible explicación para la existencia de un excesiva cantidad de personas con SM durante las últimas décadas puede ser el elevado contenido de carbohidratos en la dieta, sobre todo en los países industrializados y como consecuencia del estilo de vida de éstos (Martínez, 2011).

Es de particular interés en este estudio correlacionar el impacto negativo que tiene el SM sobre el aprendizaje y la memoria, ya que la adquisición de SM se ha asociado con el incremento en la predisposición a deterioro cognitivo (Yaffe, 2004 y 2009 y Yates, 2010). Sin embargo es esencial definir primero qué es el aprendizaje y qué es la memoria, así como describir su clasificación para de esta manera comprender mejor los cambios existentes.

3. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje se ha definido como el proceso para adquirir nueva información por medio de la experiencia, ésta permite al organismo desarrollar nuevas formas de conducta de modo rápido y eficaz (Kandel, 1997; Morgado, 2005). El aprendizaje puede ser de dos tipos: a) asociativo, que es un cambio conductual debido a la exposición repetida de estímulos relacionados con proximidad temporal, que tiene consecuencias y validez predictivas dadas entre el estímulo y la consecuencia de la ejecución de cierta conducta (Morgado, 2005). Ejemplos de éste, son el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante; b) no asociativo, que es un cambio conductual que se presenta como consecuencia de la exposición repetida a un estímulo que no está relacionado con otro y que genera cambios en la respuesta de dicho estímulo; ejemplos de éste son la habituación y la sensibilización (Kandel, 1997).

Además, el aprendizaje es un proceso adyacente a la memoria, que es el proceso por el cual un organismo tiene la capacidad de codificar, almacenar y recuperar información del pasado (Dash, 2011). Ambos procesos, aprendizaje y memoria, están estrechamente relacionados, e incluso pueden presentarse conjuntamente, lo que provoca que el análisis y comprensión de ambos procesos sea por demás

complicado. Debido a que el aprendizaje es una modificación de la conducta por medio de la experiencia, éste implica un tipo de memoria específico como la memoria de trabajo o la visuoespacial (Kandel, 1997; Morgado 2005). Kandel propone entonces un tipo de memoria específico para comprender así este trabajo paralelo entre el aprendizaje y la memoria y lo llama memoria visuoespacial de trabajo (Kandel, 1997).

La memoria involucra el almacenamiento de información y la capacidad para usar el conocimiento adquirido como producto de la experiencia (Kandel, 1997 y Dash 2011). Esto permite el almacenamiento, retención y evocación de lo que se aprende, por lo que ambos procesos en conjunto, tanto el aprendizaje como la memoria, son propiedades del sistema nervioso que permiten resolver una multitud de problemas con los que el organismo se enfrenta al ambiente a través de la combinación de las características de ambos procesos. La memoria constituye uno de los procesos más importantes para la cognición humana. Múltiples estudios han asociado este proceso a una estructura específica del cerebro, llamada hipocampo. Éste es una estructura subcortical que se encuentra en los cerebros de los mamíferos y que ha sido relacionada con diversos tipos de aprendizaje y procesos de memoria (Khorshidahmad, 2012).

Han existido diversos tipos de clasificación de la memoria a lo largo de su estudio; desde la propuesta hecha por William James donde distinguía entre memoria primaria y secundaria, y que posteriormente Atkinson y Shiffrin (1968) retomarían en su modelo de almacenamiento múltiple, donde distingue tres tipos de memoria: la memoria sensorial, la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo.

Posteriormente, Larry Squire propuso una taxonomía de la memoria basándose en los estudios clínicos de pacientes como HM (Milner et al.1998). Esta se dividía en dos tipos, la memoria declarativa y la memoria no declarativa. Mientras tanto, Tulving (1985) propuso un modelo que incluye tres sistemas: la memoria semántica, la memoria procedimental y la memoria episódica. Este modelo se llamó “Sistemas Múltiples de Memoria” en el que Tulving define al proceso de memoria como la interacción entre los mecanismos de adquisición, retención y evocación que utilizan

ciertas reglas de operación (Tulving, 2002). En una categorización más reciente, Squire (2004) integra su modelo con el propuesto por Tulving para dar lugar a una clasificación de la memoria dividiéndola en memoria explícita o declarativa, que aborda hechos y acontecimientos, la cual es consciente. Por otro lado, la memoria implícita o no declarativa, siendo ésta inconsciente. Ésta comprende otros tipos de aprendizaje, priming, condicionamiento clásico, así como habilidades y hábitos. Squire (2004) incluye en su modelo de memoria a largo plazo las principales estructuras cerebrales relacionadas con cada tipo de memoria, además de las categorías de aprendizaje asociativo y no asociativo. Con lo anterior se llegó a un modelo de la taxonomía de la memoria el cual se muestra en la Figura 1.

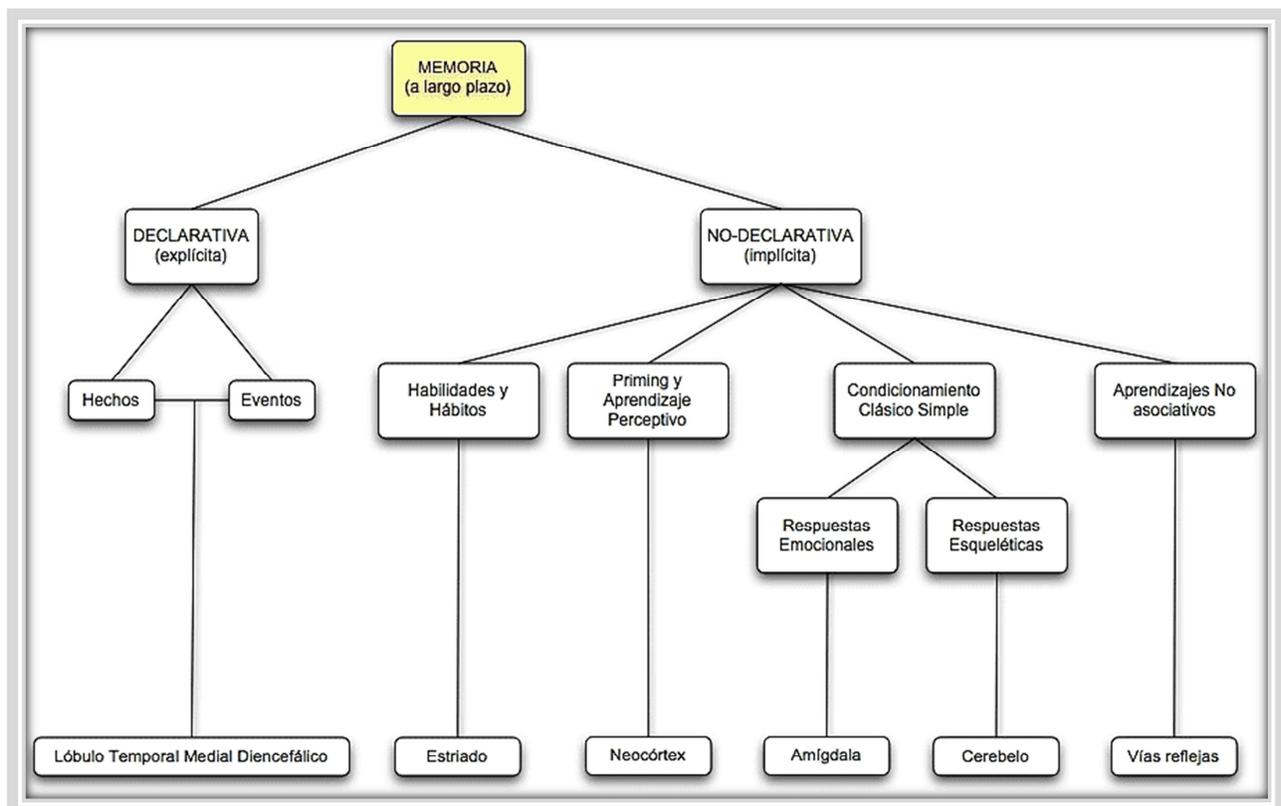


Figura 1. Taxonomía de los sistemas de memoria de largo plazo. Se clasifican los distintos tipos de aprendizaje y memoria, además de las estructuras cerebrales correspondientes a cada tipo de memoria (Modificado de Squire, 2004).

Otra clasificación de la memoria está basada en el tiempo que la información permanece almacenada e incluye al menos dos clases: 1) la memoria de corto plazo

(MCP) que es un sistema para almacenar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo (minutos, segundos u horas), es una memoria inmediata para los estímulos que acaban de ser percibidos (Margado, 2005, Etchepareborda & Abad-Mas, 2005); 2) la memoria de largo plazo (MLP) que consiste en la capacidad de almacenar una gran cantidad de información durante un tiempo indefinido que puede ser desde semanas hasta años. Este tipo de memoria requiere de la integridad de regiones diencefálicas y temporales mediales (Squire, 1987). A diferencia de la MCP, la MLP es una memoria estable y duradera, además de muy poco vulnerable a las interferencias (Margado, 2005; Etchepareborda & Abad-Mas 2005).

Como se puede observar, múltiples sistemas y clasificaciones se han sugerido para la memoria. Otros de los subtipos de memoria que se ha distinguido son la memoria de trabajo y la visuoespacial, cuya relevancia se destaca en esta investigación.

3.1 Memoria de Trabajo

La memoria de trabajo, entendida como la recuperación de información que se requiere para realizar una tarea inmediata, ya sea cognitiva o motora, resulta primordial para la resolución de problemas debido a que es un sistema interactivo que mantiene la información adquirida recientemente, teniéndola disponible para un mayor y mejor procesamiento según las demandas actuales del medio, para cumplir un propósito en particular; ésta se localiza en lóbulo frontal (Baddeley, 2003 y 2012; Dash 2011). La definición de memoria de trabajo se desarrolló a partir de la memoria a corto plazo y es supuesta como base de procesos del pensamiento en humanos, y que proporciona un puente conectivo entre percepción, MLP y acción (Baddeley, 2003).

3.2 Memoria Visuoespacial

A la recuperación de la información para ubicarnos, orientarnos y desplazarnos espacialmente en un entorno por medio de claves visuales se le llama memoria visuoespacial (Xavier, 2009). Ésta resulta relevante tanto en seres humanos como en roedores porque permite reconocer el contexto y ambiente en el que se desenvuelve, recordando así claves o señales que faciliten la resolución de un problema específico (Xavier, 2009). Por su lado, Tolman (1948, revisado en Gutiérrez-Guzmán, 2011) postuló que los individuos forman una representación cognoscitiva del ambiente o mapa cognoscitivo, para lo cual realizan una organización interna de la información para localizar un lugar mediante la relación que guarda con otras señales del ambiente. La memoria visuoespacial forma parte de la memoria de tipo declarativa, que incluye conocimientos y significado de hechos tales como los lugares, cosas o personas. A su vez, la memoria declarativa se subdivide en episódica y semántica. La memoria episódica, se relaciona con experiencias específicas en contextos particulares, como el tiempo y lugar en el que sucede un evento, es por eso que la memoria visuoespacial es un ejemplo de ésta (Spritzer *et al*, 2011).

La memoria visuoespacial ha sido asociada con el hipocampo, localizado dentro del lóbulo temporal y que forma parte del sistema límbico (Khorshidahmad, 2012). Específicamente se ha relacionado con el área CA1, ya que diversos estudios muestran que lesiones en esta área del hipocampo provoca pérdida de la misma (Gelinas, 2008 y Gutiérrez-Guzmán, 2010).

En 1978, O'Keefe y Nadel propusieron una clasificación de las formas de navegación espacial, considerando dos tipos de estrategias; por un lado el llamado "táxico" que puede desarrollarse a través de dos mecanismos, aprendizaje de orientación y aprendizaje de guía y por otro lado la estrategia "cartográfica" (revisado en Gutiérrez-Guzmán, 2011).

Estrategias táxicas:

- Aprendizaje de orientación o egocéntrico. Los animales aprenden a emplear programas motores estereotipados y localizan el camino hacia un lugar aprendiendo series de movimiento de orientación. Esta estrategia es dependiente del cuerpo estriado.
- Aprendizaje de guía o señal. Los animales tienden a aproximarse a una señal directamente sobre o en dirección de la meta. Emplean estímulos como señales hacia las que los animales aprenderán a aproximarse por hallarse asociadas a la meta. Es dependiente del cuerpo estriado.

Estrategia cartográfica:

- Aprendizaje de lugar. Estrategia cartográfica, se basa en localizar un lugar con respecto a la configuración de señales disponibles en el entorno circundante. Con esta estrategia se forma un mapa del entorno en el cual se encuentra la meta. Implica el aprendizaje de relaciones entre objetos, y no son los objetos en sí mismos los que actúan como estímulo discriminativo, sino la relación que estos mantienen entre sí, por esto, es asociativo. Es dependiente del hipocampo, pues el daño en el sistema hipocampal produce deficiencias en el aprendizaje de lugar tanto en ratas como en humanos (Wiener, Paul & Eichnbaum, 1989; Eichnbaum, 1999, revisado en Gutiérrez-Guzmán, 2011).

A lo largo del estudio de la memoria, diversas teorías y explicaciones han existido para establecer las bases moleculares de la memoria, a continuación se repasan las más importantes.

4. Hipocampo / Bases moleculares de la memoria

El hipocampo, también conocido anatómicamente como Cuerno de Ammón (Cornu Ammonis), es una estructura subcortical ubicada en el lóbulo temporal el cual tiene un papel fundamental en la memoria y en la conducta exploratoria, orientación y

navegación en el espacio (Khorshidahmad, 2012). Está compuesto por cuatro subdivisiones anatómicas: CA1, CA2, CA3 y CA4. Estas regiones tienen como una de sus principales características el tipo de células que poseen, llamadas neuronas piramidales debido a su forma. Aproximadamente el 90% del total de neuronas encontradas en el hipocampo son de este tipo (Sweatt, 2010). El término formación hipocampal es muy utilizado para denominar al hipocampo junto con un grupo de estructuras del sistema límbico con las que mantiene relación estrecha morfológica y funcional: giro dentado, subiculum, presubiculum, parasubiculum y corteza entorrinal (Amaral & Witter, 1995, revisado en Gutiérrez-Guzmán, 2011).

Gracias a los trabajos de Brenda Milner en 1969 con su paciente HM, se sabe hoy que ciertas memorias se almacenan en el lóbulo temporal medial, y más específicamente en el hipocampo (Kandel, 2012). Además, O'Keefe y colaboradores en 1971 mostraron que ciertas neuronas en el hipocampo de la rata registraban no solamente información de una sola modalidad sensorial, sino del espacio circundante del animal, característica que depende de la información de distintos sentidos. A estas células, a las cuales llamó posteriormente "células de lugar", disparaban selectivamente cuando el animal se encontraba en un área particular del ambiente espacial. Basados en este descubrimiento, O'Keefe sugirió que el hipocampo contenía un mapa cognitivo del ambiente externo que el animal usa para navegar con éxito en él (Carlson, 2007; Kandel, 2012).

El hipocampo recibe una gran cantidad de estímulos procedentes de diferentes áreas sensoriales y estructuras. Éstos son canalizados al hipocampo a través de la corteza perirrinal y entorrinal, que son las áreas corticales localizadas en las inmediaciones anatómicas del hipocampo cerca de la fisura rinal en el lóbulo temporal. Por su parte, las cortezas entorrinal y perirrinal proyectan al giro dentado y al hipocampo (a estas dos estructuras se les denominan conjuntamente formación hipocampal) (Sweatt, 2010, Carlson, 2007). Por lo tanto, las principales aferencias y eferencias neocorticales de la formación hipocampal se conducen a través de la corteza entorrinal. Las neuronas de ésta transmiten la información aferente a las células granulosas de la circunvolución dentada mediante un haz de axones llamado

vía perforante. Estas neuronas envían luego axones al campo CA3 del hipocampo y las terminales de las fibras procedentes de la circunvolución dentada establecen sinapsis con espinas dendríticas de las células piramidales del campo CA3 (Carlson, 2007). Los axones de las células piramidales de CA3 se ramifican en dos direcciones. Una de ellas termina en el campo CA1 adyacente, donde forma sinapsis con las espinas dendríticas de otras células piramidales. La otra rama viaja a través del trigono cerebral hacia estructuras del prosencéfalo basal, entre ellas el área septal y los cuerpos mamilares. Otro sistema de axones conecta las células piramidales de CA1 de un hemisferio cerebral con las correspondientes de otro. Las células piramidales de CA1 constituyen la principal fuente de eferencias del hipocampo: envían axones a neuronas del complejo subicular, cuyos axones proyectan a su vez desde la formación hipocampal a la corteza entorrinal (Carlson, 2007) (ver Figura 2).

En cuanto a las características neurofisiológicas del circuito hipocampal que median la memoria declarativa, se destacan tres propiedades fundamentales:

1. Aferencias convergentes desde prácticamente todas las áreas de asociación cortical que se distribuyen ampliamente en la población celular del hipocampo (Amaral & Witter, 1989). De esta forma, las células principales de CA3 reciben considerable información perceptual de alto nivel sobre el estímulo atendido, así como claves espaciales referidas al mismo.
2. Conexiones recurrentes desde las áreas principales de CA3 a otras regiones de CA3. Estas conexiones están ampliamente distribuidas en la población de CA3 y envuelven las principales sinapsis excitatorias de glutamato (Amaral & Witter, 1989).
3. Potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés), la característica más llamativa del hipocampo es su rápida plasticidad sináptica (Bliss y Collingridge, 1993). En particular una forma de LTP dependiente de los receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) fuertemente asociados a la memoria (Morris, 2000).

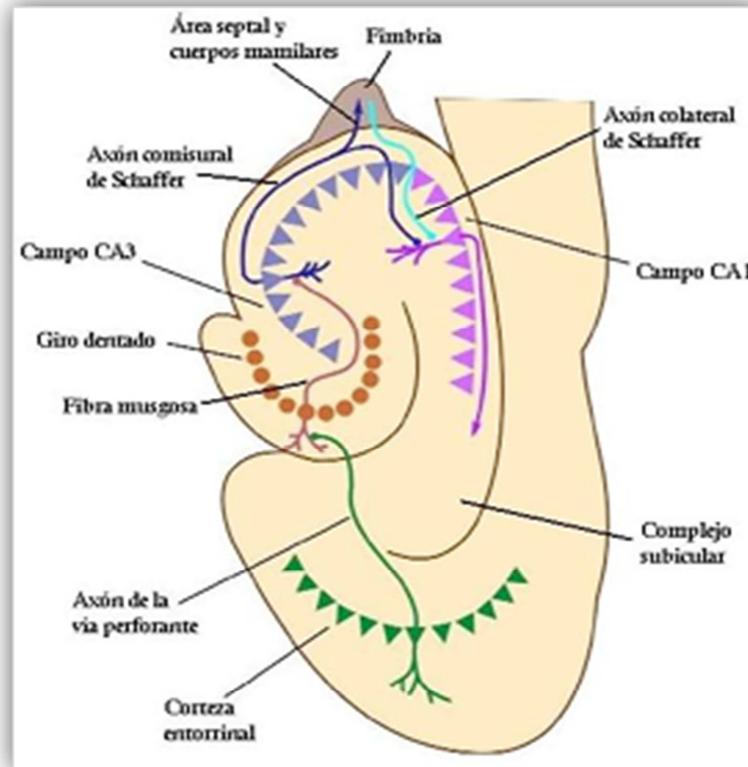


Figura 2. Conexiones entre las partes constituyentes de la formación hipocámpica. Las principales aferencias y eferencias neocorticales de la formación hipocámpica se conducen a través de la corteza entorrinal. Las neuronas de la corteza entorrinal transmiten la información aferente a las células granulosas de la circunvalación dentada mediante un haz de axones llamado vía perforante. Estas neuronas envían luego axones al campo CA3 del hipocampo. Los terminales de las fibras procedentes de la circunvalación dentada establecen sinapsis con espinas dendríticas de las células piramidales del campo CA3. Los axones de las células piramidales de CA3 se ramifican en dos direcciones, una de ellas termina en el campo CA1 adyacente, donde forma sinapsis con las espinas dendríticas de otras células piramidales. La otra rama viaja a través del trigono cerebral hacia estructuras del prosencéfalo basal. Las células piramidales de CA1, por su parte, constituyen la principal fuente de eferencias del hipocampo; envían axones a neuronas del complejo subicular, cuyos axones proyectan a su vez desde la formación hipocámpica a la corteza entorrinal y también al prosencéfalo basal a través de la fimbria. (Carlson, 2007).

Los esfuerzos encaminados a descubrir el sustrato molecular de la memoria comenzaron con la publicación de *“La Organización del Comportamiento”* en 1949 por Donald Hebb. En este postulado Hebb propone que las sinapsis no son permanentes sino que existen mecanismos por medio de los cuales se pueden

fortalecer (Carlson, 2007). Hebb propuso que la formación de memoria se produce porque la actividad que se genera en el ensamble neuronal (subgrupo de neuronas que están participando en la representación de un evento mediante patrones de actividad coordinada) induce cambios estructurales que traen consigo el fortalecimiento de sus conexiones, la cual hace más probable la respuesta de las neuronas para así representar un trazo de memoria. La reactivación de las neuronas que participaron en la experiencia puede producir el recuerdo del trazo de memoria (Hebb, 1949). Éste postulado sentó las bases de la teoría moderna de la plasticidad cerebral (Carlson, 2007).

Asociado con lo anterior y gracias a los estudios de Bliss y Lomo en 1973 se mostró que ciertas sinapsis provenientes de la vía perforante del hipocampo tienen notables capacidades plásticas que pueden ayudar en el almacenaje de la memoria. Ésto se constató tiempo después, mediante la estimulación electrofisiológica con un tren de alta frecuencia aplicado a una de las tres grandes vías hipocampales; en estas condiciones, se fortalece la transmisión sináptica. Este fenómeno, consiste en un proceso de plasticidad sináptica que se ha involucrado en actividades moleculares subyacentes a los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss y Lomo, 1973; Schuster, 1996; Nassireslami, 2013). Se han caracterizado dos distintas fases temporales de LTP en el hipocampo. Primeramente, la fase temprana de la LTP (E-LTP por sus siglas en inglés), la cual tiene una duración de minutos a horas y no es dependiente de la síntesis de proteínas; solamente requiere de la fosforilación de proteínas ya existentes, por lo tanto a esta fase se le relaciona con la MCP. Por otra parte, la fase tardía del LTP (L-LTP, por sus siglas en inglés), que dura de horas a días, requiere de la síntesis de nuevas proteínas y RNA, además recluta la vía de señalización de AMPc/PKA/CREB y está implicada en la MLP (Kandel, 2012). El LTP tiene diferentes características dependiendo la localización de éste en el hipocampo. Así entonces en la vía perforante y en la colateral de Schaffer, la LTP es asociativo, es decir, requiere proximidad pre-sináptica seguida de actividad post-sináptica. Por otro lado, en la vía de las fibras musgosas el LTP es no asociativo; no requiere actividad sincrónica entre fenómenos pre y post-sinápticos (Kandel, 2012). Se sabe que cuando las moléculas de un neurotransmisor se unen a los receptores

postsinápticos de una espina dendrítica despolarizada, la sinapsis se refuerza. Experimentos con la LTP han concluido que requiere: a) activación de la sinapsis, y b) despolarización de la membrana post-sináptica. El neurotransmisor particularmente encargado de este proceso es el glutamato, cuyos efectos postsinápticos modulan los receptores NMDA (Carlson, 2007).

Fue en 1986 cuando Morris realizó los experimentos que resultaron ser la conexión entre el LTP y la memoria visuoespacial mostrando que los receptores NMDA deben ser activados para el aprendizaje espacial en rata, además de que la señalización de los receptores NMDA a través de la vía de AMPc/PKA/CREB está estrechamente relacionada con los procesos de fosforilación de proteínas en hipocampo, hecho que resulta importante para este estudio (Abel, 2008). Lo anterior llevó a realizar correlaciones más detalladas entre la memoria y las diferentes fases del LTP. Por un lado, la fase temprana del LTP involucra cambios pre-sinápticos y post-sinápticos independientes, mientras que la fase tardía depende de cambios estructurales coordinados tanto en células pre-sinápticas como post-sinápticas por la acción de uno o más mensajeros que aseguren el orden y coordinen el remodelamiento de los dos componentes de la sinapsis (Kandel, 2012).

El grupo de Gutiérrez-Guzmán (2011) revisa diversos estudios clínicos y experimentales que indican que las lesiones del hipocampo o de las estructuras asociadas (fimbria, fórnix, séptum, corteza entorrinal y giro dentado) provocan deficiencias graves y permanentes en el aprendizaje y la memoria.

Evidencia experimental detalla que un área específica del hipocampo como lo es CA1, resulta crucial para la formación de memoria a largo plazo tanto en roedores como en humanos (Gelinas, 2008). Bliss y Collingridge en 1993 reportaron que ciertas alteraciones persistentes en la fuerza de la sinapsis subyacentes a CA1, por lo que se ha postulado que daños específicos en esta región resultan en alteraciones en la memoria y más específicamente de la memoria visuoespacial (Barnes, 1998). Estos cambios en la fuerza sináptica son afectados por una serie de eventos moleculares específicos. Entre las moléculas implicadas se encuentra el 3'5'adenosin monofosfato (cAMP), el cual es un segundo mensajero altamente

implicado en procesos subyacentes al hipocampo como la plasticidad sináptica o la memoria. El principal objetivo del cAMP en células de mamíferos es la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), la cual está expresada uniformemente y que además se ve implicada en la transducción intracelular y la transmisión intercelular en vertebrados e invertebrados (Nguyen, 2003).

5. *Vía de PKA*

Las proteínas cinasas son enzimas capaces de activar o desactivar la actividad de otras proteínas mediante el mecanismo de fosforilación, tomando un papel relevante en cascadas de señalización química, por lo que sirven de intermediarios entre los segundos mensajeros y las respuestas concernientes a éstos (Abel, 2008). Por su parte, la fosforilación es una modificación química covalente que utilizan las células para el control de las propiedades de una gran variedad de proteínas como las enzimas, receptores, canales. Ejemplo de lo anterior son las proteínas cinasas que son fosfotransferasas que catalizan un grupo fosfato del ATP en grupos alcohol de los residuos serina y/o treonina o un grupo fenol de tirosina en cadenas de péptidos. (Micheau, 1999).

Existe una variedad de proteínas cinasas, entre las principales, la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa B (PKB/AKT), la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa MZ (PKMz). Todas ellas constituyen un papel importante en el ciclo celular, estableciendo cada una de ellas funciones específicas (Abel, 2008). La PKA en particular, se ve implicada en mecanismos de regulación del metabolismo de los lípidos y de la glucosa a través de la fosforilación de una proteína, catalizando una molécula y provocando la reacción química de ATP (trifosfato de adenosina) a ADP (bifosfato de adenosina). Su actividad depende de la concentración de cAMP (adenosín monofosfato cíclico), por lo que también es conocida como proteína cinasa dependiente de cAMP. Como las demás cinasas, está compuesta de dos dominios; uno catalítico y otro regulador, ambos con dos subunidades respectivamente como se ilustra en la Fig. 3 (Spatz, 1995). En su estado inactivo se

encuentra en forma de tetrámero, sin embargo, la unión de dos moléculas de AMPc, a cada una de las subunidades reguladoras, provoca un cambio conformacional en la enzima, del que resulta la separación de las 4 subunidades y la activación de las subunidades catalíticas (ver Figura 3).

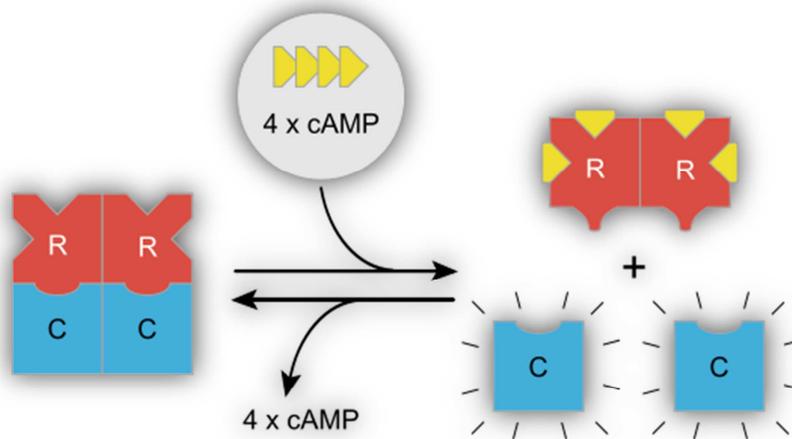


Figura 3. La proteína cinasa A está formada por dos dominios; uno catalítico y otro regulador. El incremento en los niveles de AMPc en la célula conduce a que este se una a las subunidades regulatorias de PKA, causando a su vez, un cambio conformacional que libera las subunidades catalíticas (Spatz, 1995 y Kandel 2012).

Esta activación de PKA ocurre cuando los niveles de AMPc se incrementan. El AMPc se une a dos sitios específicos localizados en las subunidades reguladoras, resultando en la disociación de la holoenzima y la liberación de las subunidades C monoaméricas que a su vez pueden transferir el grupo fosfato terminal del ATP a residuos serina o treonina de sustratos proteicos (Ostreavenu, 2009). Las subunidades C son cinasas de amplio impacto que pueden ser diana de numerosas proteínas, es por eso que se necesita una señalización específica de PKA. Esta fosforilación produce un cambio de la actividad del sustrato lo que lleva a PKA a migrar al núcleo y fosforilar a CREB (cAMP response element-binding por sus siglas en inglés) que es un factor de transcripción. CREB, a su vez, regula la transcripción de genes como C-Fos, BDNF, tirosina hidroxilasa y neuropéptidos (somatostatina, VGF, CRH, etc) (Abel 2008 y Deisseroth 1996). La cascada de señalización de PKA

es activada principalmente por dos mecanismos. El primero de ellos implica calcio y calmodulinas (Ca/CaM). La entrada de calcio estimula a la adenilato ciclasa sensible a Ca/CaM, que sintetiza cAMP. La entrada de Ca^{2+} se puede dar mediante la tetanización de los receptores NMDA en la región CA1 del hipocampo. El segundo mecanismo de activación involucra la unión de transmisores químicos y hormonas con su receptor específico, seguido de la estimulación de la adenilato ciclasa por la unión de las proteínas reguladoras de guanina (proteínas G). Estas proteínas G interactúan con la adenilato ciclasa para activar la producción de cAMP (Nguyen, 2003).

La afinidad de AMPc con PKA ha sido debatida durante mucho tiempo. Un primer aspecto de especificidad para la acción de la PKA está basado en el hecho de que existe una localización subcelular específica de isoformas de PKA. Asimismo la especificidad de la acción de PKA también puede ser atribuida a la afinidad existente al AMPc, puesto que las isoformas de PKA pueden ser activadas a diferentes concentraciones de AMPc (Nguyen, 2003 y Abel 2008).

Se sabe ahora que la PKA regula muchos de sus procesos a través de la fosforilación de proteínas. Este proceso incluye entre otras cosas el metabolismo celular, expresión de genes de desarrollo celular y tisular, excitabilidad neuronal, conductividad de canales iónicos (Nguyen, 2003 y Abel 2008). También se ve implicada en procesos que incluyen plasticidad sináptica o que son dependientes de la misma. Estudios muestran que la activación inducida de PKA genera LTP de larga duración o fase tardía (L-LTP) (Nassireslami, 2013), como se ilustra en la Figura 4.

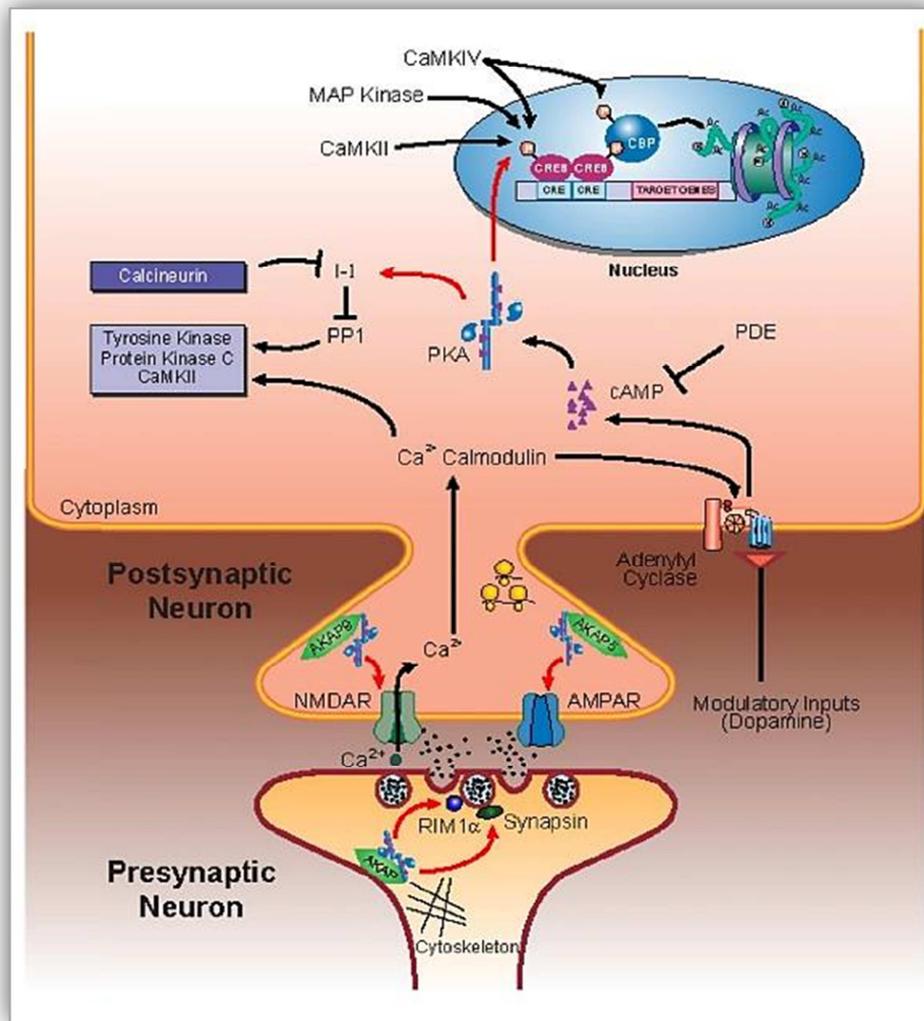


Figura 4. Vía de señalización de AMPc/PKA. Esta vía regula componentes moleculares subyacentes a la potenciación a largo plazo y la MLP (Nguyen, 2003 y Nassireslami, 2013).

6. PKA y memoria

Un creciente número de vías de señalización intracelular han sido identificadas por su participación en la traslación de señales a la sintaxis de la representación neural de la memoria. Entre las proteínas que han sido identificadas en la memoria visuoespacial específicamente incluyen al NMDA, los receptores a serotonina (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT6, 5-HT7), CaMKII, proteínas CREB, PKC, el óxido nítrico y PKA. Estas señales intracelulares empiezan probablemente

con el cierre de los canales de potasio y el incremento en la entrada de calcio que, entre otras funciones, desencadena reacciones de fosforilación/desfosforilación. Así, los altos niveles intracelulares de calcio promueven la fosforilación, mientras que niveles bajos estimulan la actividad de las fosfatasas (Morris et al., 1999). En procesos cognitivos complejos como lo son el aprendizaje y la memoria se requiere de una alta efectividad en la actividad enzimática que dure por lo menos minutos o incluso horas, y esto requiere mucho más que el flujo de calcio existente a través de la membrana. Estos factores/proteínas que ayudan a mejorar esta efectividad han sido tema de discusión por muchos años debido a que su participación específica en estos procesos sigue sin esclarecerse del todo.

La implicación del sistema de PKA en la memoria ha sido tema de estudio durante décadas. Fue Eric Kandel quien propuso un modelo que hoy en día resulta ser fundamental en el estudio de la memoria y sus bases moleculares (Kandel, 1989). Kandel utilizó a la *Aplysia californica* como modelo establecen un mecanismo molecular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria. Este mecanismo es el sistema de PKA dependiente de fosforilación, cuya participación en procesos como la memoria ha mostrado que dicho sistema facilita la formación y almacenamiento de información. El experimento de Kandel consistía en estimular mecánicamente el sifón de la *Aplysia*, causando que retrajera su branquia para protegerla. Esta acción ocurría debido a que la estimulación activaba receptores en el sifón, que a su vez activaba, de manera directa o indirecta, la motoneurona específica que retrae la branquia. Sin embargo cuando esta misma estimulación persistía en el tiempo, la *Aplysia* aprendía que éste no resultaba ser un estímulo que la pusiera en peligro, por lo que después de un tiempo y ante el mismo estímulo, ya no existía la retracción de la branquia. A este tipo de aprendizaje se le llamó habituación (Kandel, 2000) (ver Figura 5). Posteriormente, Kandel procedió a estimular la cola de la *Aplysia* justo antes de estimular el sifón, lo que generó como respuesta una retracción más rápida y enérgica de la branquia. A este proceso, Kandel le llamó sensibilización e involucra sinapsis serotoninérgicas. Como se puede ver en la Figura 6, la activación de los receptores de la cola activan mediante una neurona sensorial, una interneurona facilitadora que excita la neurona, generando la

liberación de diferentes neurotransmisores, incluida la serotonina (5-HT), la cual se une a receptores acoplados a proteínas G que activan la adenilato ciclasa para la producción de AMPc. Este AMPc activa la PKA, que mediante la fosforilación, cierra los canales de potasio e incrementa la entrada de calcio, aumentando así la liberación de neurotransmisores (Kandel, 2000).

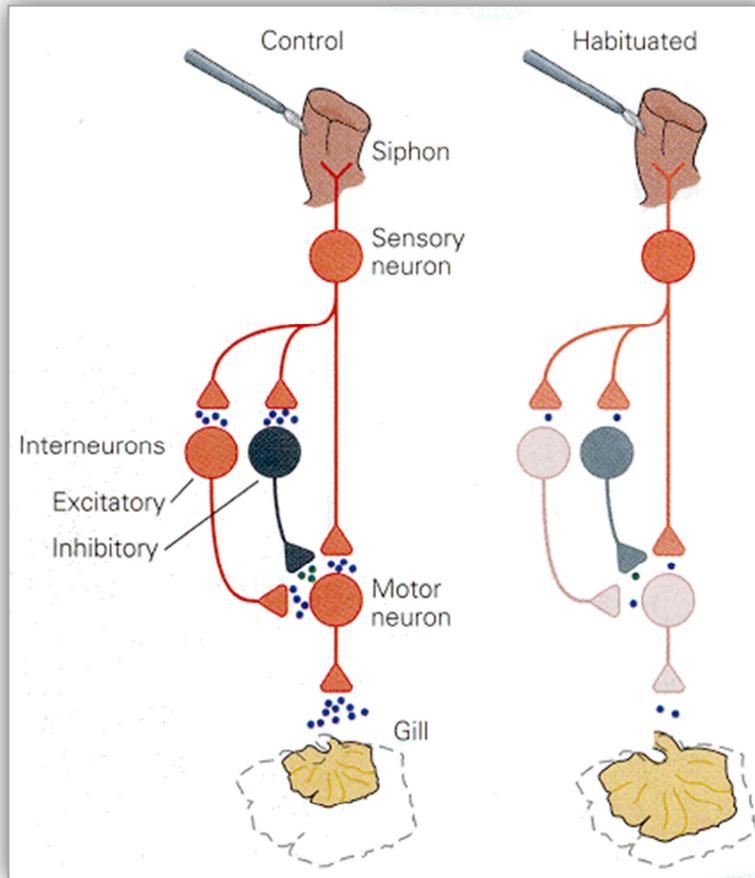


Figura 5. Circuitos neuronales simplificados implicados en la habituación de la Aplysia. La condición control se muestra a la izquierda, la condición de habituación a la derecha. (Kandel, 2000)

Tiempo después, Kandel propuso la LTP como el modelo molecular para explicar el mantenimiento de la memoria a largo plazo, siendo hoy día la explicación más clásica y fehaciente para entender la MLP (Kandel, 1989). La LTP, consiste en un proceso de plasticidad sináptica que como ya se mencionó, junto con sus dos

diferentes fases correlacionan con el hecho de que la memoria a corto plazo depende de la participación y modificación de las proteínas post-sinápticas, es decir, con el proceso de E-LTP, mientras que la memoria a largo plazo depende de la

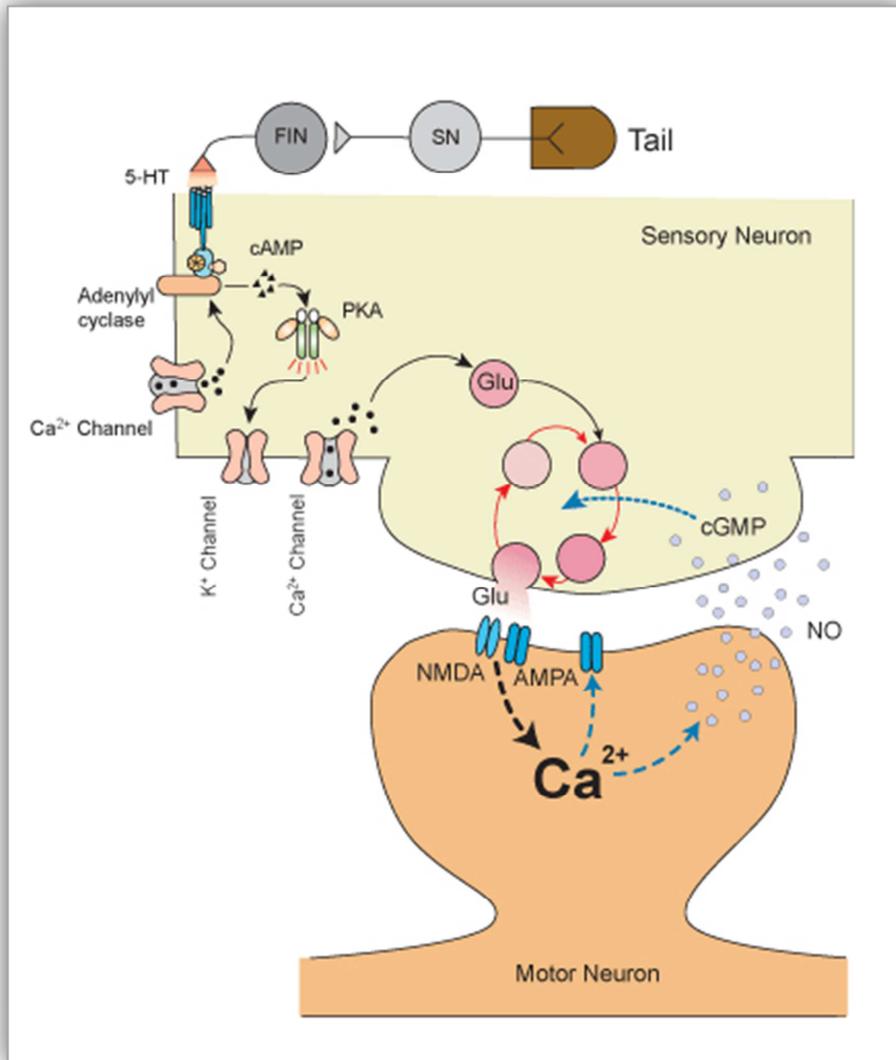


Figura 6. Eventos químicos y sinápticos subyacentes al proceso de facilitación presináptica involucrada en producir la sensibilización (Kandel, 2000).

señalización intracelular y de la regulación de la transcripción de nuevas proteínas, características fundamentales del L-LTP (Hernández, 2008). Por lo que ambos procesos, pero sobre todo el L-LTP, resultan fundamentales para el objetivo de este estudio. El resumen de este modelo se ilustra en la Figura 7.

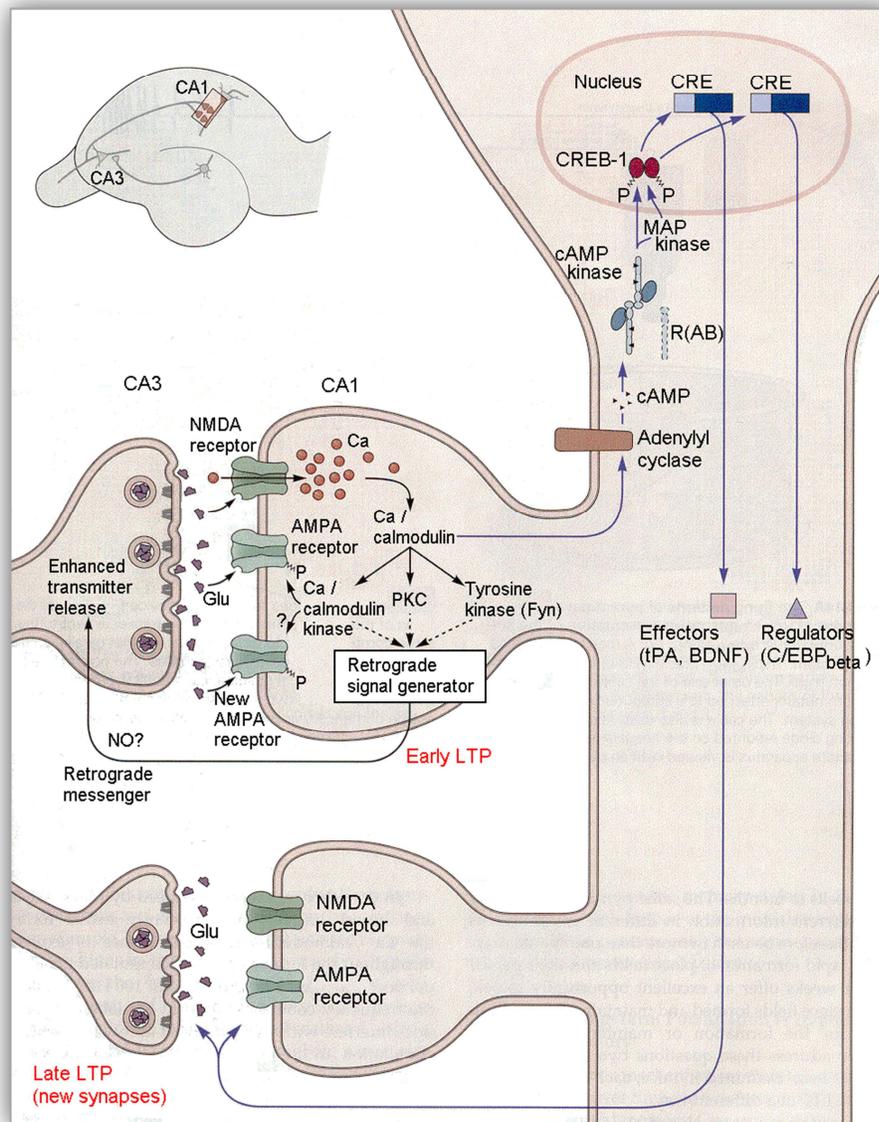


Figura 7. Procesos moleculares subyacentes al modelo de LTP propuesto por Kandel (Kandel, 2000). Ambas fases de la LTP, la E-LTP y la L-LTP, están caracterizadas por una serie de tres eventos: inducción, mantenimiento, y expresión. La inducción es el proceso por el que una señal de vida corta dispara el comienzo de la LTP. El mantenimiento corresponde a los cambios bioquímicos persistentes que ocurren en respuesta a la inducción de dicha fase (mantenimiento). La expresión implica los cambios celulares que resultan de la activación de la señal de mantenimiento. La inducción de E-LTP ocurre cuando la concentración de calcio dentro de la célula postsináptica excede el umbral basal. Mediante manipulación experimental, un estímulo no tetánico puede ser aplicado a la célula presináptica, causando que libere un neurotransmisor (típicamente glutamato) en la hendidura sináptica. Ahí, el glutamato se une a los receptores AMPA (AMPA) incrustados en la membrana postsináptica. El receptor AMPA es uno de los receptores excitatorios principales en el cerebro. La

unión del glutamato al AMPAR dispara el influjo de iones sodio cargados positivamente a la célula postsináptica, causando una despolarización de vida corta llamada potencial postsináptico excitatorio (EPSP). Por otro lado la L-LTP depende de la activación de sinapsis no glutamatérgicas. Estas sinapsis 'moduladoras', que pueden ser dopaminérgicas, noradrenérgicas o colinérgicas, inducen la síntesis de nuevas proteínas necesarias para que se mantenga la LTP. La síntesis de nuevas proteínas es activada por la cascada AMPc/PKA. Esta actúa directamente aumentando la actividad cinasa Ca/calmodulina dependiente (CAMK-II) que fosforila a CREB, que también puede ser fosforilado mediante con aumento de AMPc a través de la PKA. CREB se une a los sitios CRE, que son secuencias de ADN que constituyen regiones regulatorias de genes, cuya expresión responde al AMPc. Finalmente, esta fosforilación de CREB inicia una verdadera cascada transcripcional, con expresión de factores de transcripción, neuropéptidos, factores de crecimiento, enzimas y proteínas de adhesión celular implicados en la memoria a corto plazo (MCP), independiente de la síntesis proteica, a la memoria a largo plazo (MLP), dependiente de esa síntesis (Deisseroth, 1996; Schuster, 1996; Yin, 1996; Almaguer, 2005).

La evidencia molecular establece que una vez activada la PKA, ésta puede fosforilar diferentes corrientes y factores de transcripción implicadas en la formación de la memoria. (Abel 2008 y Ma, 2009). Además, tiene un papel específico en diferentes fases de la memoria (Petri-Guerra, et al. 2011). Experimentos en la *Drosophila*, mostraron la implicación de PKA en el aprendizaje y la memoria en experimentos genéticos y moleculares con expresión transgénica inducida de un péptido inhibidor de PKA que perjudica el aprendizaje asociativo de las moscas transgénicas (Drain et al., 1991, revisado en Abel 2008). Sin embargo, la evidencia más clara acerca del importante papel que tiene PKA en el aprendizaje y la memoria en roedores viene de Abel y colaboradores, quienes en 1997 utilizaron un acercamiento genético, generaron ratones transgénicos a los cuales les expresaron el dominio negativo de una subunidad regulatoria de PKA. Estos ratones mostraron un aprendizaje normal en el laberinto de Morris, sin embargo exhibieron déficits en la memoria durante la prueba de recuperación.

Una prominente literatura ha mostrado que la activación de PKA mejora las funciones de la memoria a largo plazo en el hipocampo, específicamente cuando se administra algún activador en la fase de consolidación (Sharifzadeh, 2007 y 2010). Además, esta misma activación de PKA se ha visto que es capaz de revertir problemas en la memoria a largo plazo (Arsten, 2005). Por otro lado, evidencia en el campo de la electrofisiología muestra que déficits específicos en la actividad de PKA en hipocampo se correlaciona con una falla en tareas de memoria a largo plazo dependiente de hipocampo. Sin embargo la memoria a corto plazo no se ve afectada (Nguyen, 2001). Además, investigaciones han mostrado que distintas fases de la memoria pueden ser mediadas por mecanismos o vías moleculares. El grupo de Petri-Guerra (2011) realiza una revisión por las diferentes investigaciones que correlacionan al sistema de PKA con la memoria, encontrando que éste sistema está relacionado con las fases finales de la consolidación de la memoria, proceso que requiere de síntesis de nuevas proteínas.

Se sabe que PKA regula por lo tanto, diversos procesos biológicos y moleculares por medio de la fosforilación de proteínas (Abel, 2008). Estudios recientes establecen la relación entre PKA y la memoria (Abel, 2008; Petri-Guerra, 2011; Vázquez, 2000; Havekes, 2007; Sunyer, 2009). Además de lo anterior, evidencia experimental apoya la influencia que tienen inhibidores (Quevedo, 2004; Miskiw, 2010; Petri-Guerra, 2011; Assis Souza, 2012; Eftekhazadeh, 2012) y activadores (Sharifzadeh, 2007, 2010 y Petri-Guerra, 2011) del sistema de PKA en el comportamiento de la memoria visuoespacial.

Varias han sido las estrategias para mejorar las tareas de memoria, tanto con inhibidores como con activadores. Sin embargo, Sharifzadeh y colaboradores en el 2007 y 2010 realizan pruebas contundentes en las que establecen una manera eficaz y aparentemente estable para el incremento de la actividad de la vía de PKA por medio de un activador de la misma (bucladesina), y cuya consecuencia se ve reflejada en un mejoramiento conductual, en este caso, de la memoria visuoespacial (mediante el laberinto de Morris). La bucladesina, también llamado dB-AMPC, es un análogo permeable de AMPC e inhibidor de fosfodiesterasas. Este compuesto ha

sido ampliamente utilizado debido a su docilidad en su manejo, ya que mimetiza el AMPc e induce respuestas fisiológicas normales en las células bajo condiciones experimentales (Rundfeldt, 2012). Además, su alta especificidad por el AMPc, lo convierten en una maniobra experimental eficaz y segura en condiciones experimentales (Neumann, 2002; Qiu, 2002).

En el ámbito clínico, dB-AMPc ha sido susceptible de uso médico en el pasado, ya sea como tratamiento sistémico para la protección cardiaca y como tratamiento tópico para mejorar la cicatrización de heridas. En Japón, se utilizó un ungüento a base de bucladesina y se comercializó para el tratamiento de úlceras en la piel. Además, estudios clínicos han mostrado efectos favorables en el pie diabético. Sin embargo el compuesto se retiró tiempo después a pesar de su buena tolerancia (Rundfeldt, 2012). Experimentalmente, el dB-AMPc ha sido mayormente utilizado como estrategia para incrementar los niveles de AMPc y regenerar axones sensoriales dañados en la médula espinal (Neumann, 2002, Qiu, 2002, Sari, 2008), y como posible mecanismo farmacológico regulador de procesos reproductivos, mejorando la fertilidad en roedores (Balazi, 2012, Chrenek, 2010, 2013).

En estudios que implican al dB-AMPc con la memoria, Sharifzadeh en 2007, 2010 y 2012 muestra los resultados más concluyentes utilizando una curva dosis-respuesta clásica. Los resultados de este grupo de trabajo mostraron que los animales a los cuales se les realizaron una infusión de 10 μ M y 100 μ M de bucladesina obtuvieron una reducción en la latencia de escape y la distancia total recorrida (comprobando así una mejora en la memoria visuoespacial) respecto de los animales control.

Estos datos decisivos derivaron en concluir al dB-AMPc como un compuesto susceptible de utilizarse en modelos animales como tratamiento para mejorar la memoria visuoespacial. Es por eso que en este estudio se utilizó al dB-AMPc como maniobra experimental, basándose en los antecedentes y tomando como evidencia experimental directa los estudios y dosis mostrados por Sharifzadeh en el 2007 y 2010.

7. SM y alteraciones cognitivas

Hasta aquí se dejó claro la definición del SM, sus implicaciones metabólicas y relevancia de estudio, también se definieron los procesos cognitivos subyacentes y trascendentales para este estudio (aprendizaje, memoria de trabajo, memoria visuoespacial), además de otros conceptos que resultan fundamentales en la búsqueda por establecer los nexos necesarios para cumplir los objetivos de esta investigación, por lo que es momento de revisar la conexión existente entre el SM y diversas alteraciones cognitivas en el que éste se ve implicado.

Dinel y colaboradores en el 2011 utilizaron un modelo diabético en ratón transgénico observando un deterioro en la memoria espacial (tarea dependiente del hipocampo) asociado a un incremento inflamatorio (debido a citosinas) y una reducción hasta del 60% en la expresión del RNAm de BDNF en el hipocampo, lo que ha sido estrechamente relacionado con un deterioro en la plasticidad sináptica que lleva consigo un deterioro cognitivo. Diversos estudios de tipo prospectivo con poblaciones humanas han reportado la incidencia y relación existente entre el SM y el bajo desempeño en tareas cognitivas (Yaffe, 2004 y 2009, Frisardi, 2010, Yates, 2012). Se ha mostrado entonces que el SM repercute principalmente en habilidades dependientes del funcionamiento de hipocampo.

Datos clínicos sugieren que la inflamación periférica está involucrada en la patogénesis de los síntomas neuropsiquiátricos asociados con el SM, debido a que este síndrome se asocia con la inflamación central y activación de citocinas alterando la actividad cerebral en áreas particularmente involucradas en el control de la conducta (Dinel et al, 2011).

El grupo de Yaffe en el 2004 realiza un estudio en el que aplican la prueba cognitiva Mini-Mental State, la cual evalúa la cognición en general abordándola desde diferentes rubros a una población que cursaba SM. Observaron que las personas con SM tenían una mayor predisposición a presentar una deficiencia cognitiva respecto de los controles. Asimismo, Frisardi y colaboradores en el 2010 realizaron una revisión de la literatura concerniente a esta relación. Mencionan un estudio

longitudinal con población italiana se observó que los participantes con SM tenían un mayor riesgo de desarrollar demencia que aquellos sin SM. Además confirman, a través de otros ejemplos en la literatura, la relación existente entre el SM (o por lo menos alguno de sus componentes) y el deterioro cognitivo de tipo leve.

Otro estudio de tipo prospectivo mostró que los participantes que cursan con SM arrojan puntuaciones significativamente menores en algunas áreas cognitivas en comparación con los participantes que no resultan propensos a desarrollar SM (Akbaraly *et al*, 2010). Por otro lado, se ha mostrado que en modelos animales con ratas también se encuentra que el SM genera cambios en tareas dependientes de hipocampo, como en la ejecución del laberinto en Y (Dinel, 2011) o el laberinto de Morris, en el cual, los roedores con alteraciones metabólicas obtienen un incremento en el tiempo empleado para alcanzar la plataforma de escape y, al quitar ésta, pasan menor tiempo en el cuadrante correcto (Pintana, 2012). Kanoski (2011), mostró en un grupo de ratas sometidas al consumo de una dieta alta en energía por tan solo 72 horas, una tendencia a cometer un mayor número de errores en una tarea de memoria espacial comparado con el grupo control.

Los diferentes tipos de memoria aquí mencionados (visuoespacial, de trabajo y a largo plazo) son susceptibles de medirse en roedores con diversos paradigmas de aprendizaje y memoria; un ejemplo es el laberinto de Barnes que a continuación se explica.

8. Protocolos de estudio de la memoria visuoespacial

El estudio de la memoria y el aprendizaje han sido objeto de múltiples modelos de análisis y de un sinnúmero de protocolos aplicados. Más específicamente, la memoria visuoespacial en roedores ha sido abordada desde diferentes paradigmas y modelos conductuales para evaluarla. Entre ellos se encuentran el laberinto radial de Olton y Samuelson (1976) y el laberinto de agua de Morris (1984) como los protocolos más comúnmente utilizados en la literatura especializada (ver figura 2). Posteriormente, en 1979, Carol Barnes diseñó un protocolo que a la postre resultaría básico y

esencial en la evaluación de la memoria visuoespacial. El protocolo original de Barnes consistía en una plataforma circular elevada con 18 agujeros espaciados en el perímetro. En éste, las ratas eran motivadas por la luz brillante y el espacio abierto del propio laberinto, lo que conducía a la rata a entrar en una caja de escape oscura debajo de la plataforma. Los animales usaban claves visuales extra-laberínticas para aprender la localización espacial del agujero de escape.

Si bien los protocolos del laberinto radial y el de Morris han sido ampliamente utilizados en la experimentación y en el estudio de la memoria visuoespacial y el aprendizaje, el laberinto de Barnes destaca sobre ellos debido a que no involucra un factor estresante como lo es la privación de alimento, en el caso del laberinto radial, y el nado como en el laberinto de Morris, además de que es físicamente menos desgastante para los roedores. Finalmente el desempeño del animal no depende de la reducción en la temperatura corporal causada por el múltiple entrenamiento en nado que es requerido en el laberinto de Morris (ver Figura 8). De esta forma, el laberinto de Barnes ha sido considerablemente utilizado, existiendo un gran número de modificaciones en el protocolo original, dependiendo de la pregunta que el investigador se plantee y los objetivos particulares de cada estudio. Por ejemplo, el laberinto utilizado por Seeger (2004) consistía en un disco de acrílico blanco (122 cm de diámetro) que se elevaba por encima de 90 cm el suelo y contenía 40 agujeros, cada uno de 5 cm de diámetro, equidistantes alrededor del perímetro del círculo (revisado en Brown, 2011). Por su parte Harrison (2006) utilizaba un disco circular de 90 cm de diámetro con 12 agujeros equidistantes de 5 cm y que podían ser cerrados o abiertos por medio de un deslizamiento de una puerta blanca de acrílico ajustada al agujero. Troncoso (2010) utilizaba un disco negro de 122 cms, con 18 agujeros en la periferia de los cuales solo uno daba acceso a una caja de escape. En esta versión también se utilizaban claves visuales extra-laberínticas (revisando en Brown, 2011). Las versiones son diversas, y las modificaciones constan básicamente en el número de agujeros de la plataforma, el diámetro de ésta, la altura a la que está colocada respecto al piso, la duración del ensayo (entre 3 y 5 minutos generalmente), así como los días de duración total del protocolo.

El protocolo a seguir en este trabajo está basado en el utilizado por Sunyer (2011) el cual tiene una duración total de 17 días y su metodología se detallará más adelante.

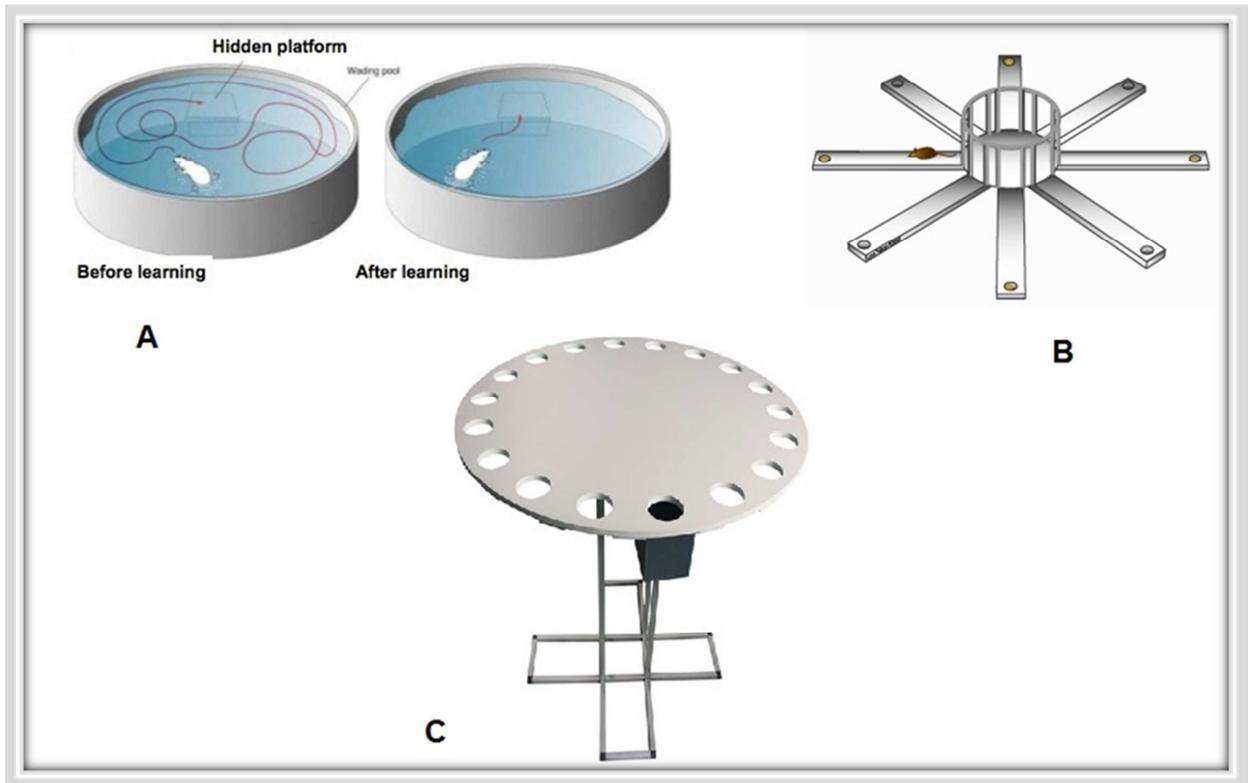


Figura 8. Laberintos utilizados para la evaluación de la memoria visuo-espacial. A) Laberinto de Morris. Fue diseñado por R.G. Morris para evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, 1984) y consiste en una piscina circular llena de agua en la que se sitúa una plataforma que debe ser localizada por el animal y cuya temperatura oscila entre 18 y 27 °C. El agua se vuelve opaca con leche o alguna sustancia no tóxica, lo que le impide ver la plataforma. El objetivo de la tarea es que los animales naden desde diferentes puntos de salida situados en el perímetro de la piscina hasta encontrar la plataforma sumergida en el agua. B) Laberinto radial. Creado por Olton y Samuelson en 1976, consiste en un laberinto que contiene ocho brazos dispuestos radialmente elevados sobre el nivel del suelo. Al final de cada uno de estos brazos hay depositada una recompensa de comida, por lo que la rata tenderá a realizar un mapa mental del laberinto de aquellos brazos ya visitados, para optimizar la búsqueda de comida. C) Laberinto de Barnes. Creado por Carol Barnes en 1979. En este experimento se sitúa la rata sobre una plataforma con varios agujeros en su perímetro, pero solo uno de ellos da acceso a un túnel inferior. La rata tenderá a buscar este agujero para ocultarse, utilizando también distintas pistas situadas fuera de la plataforma (modificado de Sunyer, 2011)

III. JUSTIFICACIÓN

El creciente índice de personas que cursan con SM en los últimos años es alarmante. De acuerdo con OMS, 1400 millones de adultos (de 20 y más años) tienen sobrepeso. Aunado a esto, el exceso de peso corporal (sobrepeso y obesidad) es reconocido actualmente como uno de los retos más importantes de salud pública en México y el mundo, dada la magnitud, rapidez de su incremento, el efecto negativo que ejerce sobre la salud de la población que la padece e incluso mortalidad (OMS, 2012). Lo anterior se suma al hecho de que el SM no solamente aumenta significativamente el riesgo de padecer enfermedades crónicas, sino que además compromete de manera negativa al organismo que lo padece en su desempeño de procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria.

Según reporta la ANSA (Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria) en el 2010 en la población total adulta de México, el 40% presenta sobrepeso y el 32% obesidad, es decir, la masa corporal de más del 70% de la población adulta es inadecuada. Lo anterior sumado a que México hoy en día, ocupa el primer lugar de prevalencia mundial de obesidad tanto en niños como adultos. Lo anterior trae como consecuencia que un alto porcentaje de la población y sobre todo de jóvenes, desarrolla o cursa con SM, según los criterios de la ATP III (Grundy, 2004). Esta alta prevalencia de sobrepeso y obesidad representa un problema de salud prioritario con miras a establecer reformas de salud pero también a destinar recursos a la investigación del SM. El SM es una patología que por ser un estadio previo a otros padecimientos como la diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares y/o deterioro cognitivo (Larqué et. al., 2011), resulta primordial conocer más de la fisiopatología de la enfermedad, de su probable control y/o recuperación del mismo una vez establecido el padecimiento, y del impacto que tiene en la cognición de pacientes que cursan con SM. De esta forma se podrá intervenir un paso antes de la aparición de padecimientos más graves como los ya mencionados.

IV. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

El síndrome metabólico constituye un problema de salud que en los últimos años ha crecido exponencialmente. Como lo menciona Grundy (2004), no solo es un estado previo al desarrollo de la diabetes, sino que es causante de varios padecimientos y alteraciones relacionadas que ponen en riesgo el bienestar de quien lo padece, como la predisposición a accidentes cerebrovasculares, el incremento en el riesgo de padecer infartos, e incluso en alteraciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje.

La memoria visuoespacial es una tarea dependiente del funcionamiento del hipocampo, por lo que una alteración en esta región provoca deficiencias graves y permanentes en el aprendizaje y la memoria visuoespacial, tanto en ratas como en humanos (Sutherland & Rodríguez 1989 revisado en Gutiérrez-Guzmán, 2011).

La implicación de la vía de PKA en la memoria ha sido tema de estudio durante décadas, pero fue Eric Kandel quien propuso un modelo que hoy en día resulta ser fundamental en el estudio de la memoria y sus bases moleculares (Kandel, 1989). Los experimentos de Kandel, utilizando a la *Aplysia californica* como modelo, establecen un mecanismo molecular que subyace a los procesos de aprendizaje y memoria. Este mecanismo es el sistema de PKA dependiente de fosforilación, cuya participación en procesos cognitivos como la memoria ha mostrado que dicho sistema tiene un papel específico en las fases finales de la consolidación de la memoria, la cual requiere específicamente de la síntesis de nuevas proteínas (Petri-Guerra, et al. 2011). Se sabe que PKA regula por lo tanto, diversos procesos biológicos y moleculares por medio de la fosforilación de proteínas (Abel, 2008). Evidencia experimental apoya la influencia que tienen inhibidores (Nijholt, 2008; Miskiw, 2010; Petri-Guerra, 2011; Assis Souza, 2012; Eftekhazadeh, 2012) y activadores (Sharifzadeh, 2007, 2010 y Petri-Guerra, 2011) del sistema de PKA en el comportamiento de la memoria visuoespacial. Sin embargo, no existen investigaciones que relacionen los cambios conductuales en la memoria visuoespacial con la activación del sistema de PKA ante una alteración metabólica inducida, en este caso el SM. No se conoce hasta el momento si la activación

persistente de la vía de PKA pudiera traer algún cambio conductual en sujetos que tengan instalado el SM; más aún, de qué manera afectaría su desempeño en una tarea de memoria visuoespacial.

A pesar de que existen estudios que establecen la relación del sistema de PKA con la memoria visuoespacial (Slack, 1991; Abel, 2008; Nijholt, 2008; Miskiw, 2010; Petri-Guerra, 2011; Sharifzadeh, 2007, 2010 y 2012), diferentes paradigmas que incluyan un plano conductual más basto y que permitan conocer una implicación más directa de PKA en la memoria, son necesarios. Esto permitirá establecer el papel específico que tiene PKA y sus procesos intrínsecos como la fosforilación, la señalización y/o su activación en tareas dependientes de hipocampo en roedores.

Con base en los antecedentes descritos, esta investigación buscó evaluar los cambios conductuales en la memoria visuoespacial (utilizando el Laberinto de Barnes) en rata cepa Wistar ocasionados por una modificación en la actividad de la vía de PKA en condiciones de SM. Para ello se empleó un activador del sistema de PKA dependiente de proteínas G, mediante un análogo de AMPc (dB-AMPc).

Lo anterior se realizó considerando las dos variables determinantes en este trabajo; la dieta (animales con SM) y la administración de dB-AMPc (animales a los que se les activó la vía de PKA por medio de dB-AMPc).

De esta forma, se buscó responder la siguiente pregunta: ¿de qué manera la activación de la vía de PKA participa en el comportamiento de la memoria visuoespacial en ratas que cursan con síndrome metabólico inducido?

V. HIPÓTESIS

H1: La modificación en la actividad de la vía de PKA en el hipocampo de ratas con SM inducido aumenta la eficiencia en la memoria visuoespacial.

VI. OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar los cambios conductuales existentes en la memoria visuoespacial por la activación de la vía de PKA en hipocampo de ratas con SM inducido.

Objetivos Particulares

- Determinar si los sujetos tratados con dieta hipercalórica desarrollan SM.
- Determinar si el SM se correlaciona con cambios conductuales en la memoria visuoespacial.
- Determinar si los sujetos con SM y activación del sistema de PKA mejoran su conducta en la memoria visuoespacial.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Sujetos

Se utilizaron 45 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso diferido entre los 250 y 300 gramos al inicio del tratamiento, aproximadamente de 8 semanas de edad. Éstas fueron suministradas por el bioterio de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas permanecieron en la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina, dentro del Laboratorio de Biofísica de Membranas y Células Troncales. El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Durante el período experimental se mantuvieron dentro de un cuarto (bioterio) en donde se situaron a las ratas por pares en cada caja. Se mantuvo un ciclo de 12 h luz / 12 h oscuridad (7 am: 7 pm) donde tuvieron libre acceso a comida y agua. La temperatura dentro del cuarto experimental osciló entre 20 y 24 °C.

7.2 Dieta

Se manejaron dos diferentes tipos de dieta; una para sujetos controles y otra para sujetos experimentales a los que se les indujo SM por medio de una dieta hipercalórica.

1. La dieta control se constituyó de alimento Purina Rat Chow. Dieta para roedores 5001; LanDiet con 28.5% proteína, 13.5% grasa, 58% carbohidratos de las calorías proporcionadas, así como agua *ad libitum*.
2. La dieta hipercalórica constituyó el mismo alimento que las controles, sin embargo se sustituirá el agua simple por una solución de sacarosa al 20% (p/v) en el agua. Ésta será *ad libitum* y se mantendrá durante todo el proceso experimental.

7.3 Grupos Experimentales

- **Grupo Control.** 8 ratas de 16 semanas de edad. No cursaron SM ni se les manipuló quirúrgicamente.
- **Grupo SM.** 8 ratas de 16 semanas de edad a las que se les sometió a una dieta alta en carbohidratos (sacarosa al 20% p/v) durante 8 semanas con el fin de inducir el SM.
- **Grupo Vehículo.** 6 ratas de 16 semanas de edad que cursaron dieta alta en carbohidratos (sacarosa al 20% p/v) durante 8 semanas para inducir SM y a las cuales se les administró solución salina (NaOH al 0.9%) mediante una cánula intracerebral colocada en la región CA1 del hipocampo previa cirugía estereotáxica.
- **Grupo dB.** 9 ratas de 16 semanas de edad con dieta normal de agua y alimento rat chow *ad libitum* a las que se les activó la vía de PKA por medio de la instilación de dibutilil-AMPC (1 μ L a una concentración de 10 μ M) mediante cirugía estereotáxica y una cánula intracerebral colocada en la región CA1 del hipocampo.
- **Grupo SM+dB.** 8 ratas de 16 semanas de edad a las que se les sometió a una dieta alta en carbohidratos (sacarosa al 20% p/v) durante 8 semanas, con el fin de

inducir el SM, y a las que se les activó la vía de PKA por medio de la instilación de dibutiril-AMPc (1 μ L a una concentración colocada en la región CA1 del hipocampo.

7.4 Mediciones

Una vez transcurridas 8 semanas de tratamiento (Larqué et. al., et al. 2011) se realizaron diversas mediciones a los sujetos que sirvieron como criterios de inclusión para determinar la instalación del SM en el sujeto según los criterios de la ATP III (Grundy et al., 2004). Éstos serán los siguientes:

- o **Peso del sujeto.** Evaluado como criterio si el sujeto gana por lo menos el 20% de su peso inicial. Se pesó a los animales una vez por semana durante 13 semanas totales.
- o **Consumo de agua y alimento (promedio).** Se midió diariamente y se obtuvo un promedio semanal de todos los grupos para conocer si existieron diferencias en el consumo entre cada uno de ellos. Esta medición se realizó durante 11 semanas
- o **Medición del índice de masa corporal (IMC) y grasa visceral** por medio de un sistema de impedancia. Éste describe las propiedades eléctricas pasivas de materiales biológicos de eventos fisiológicos. Por medio de dos electrodos se inyectó una corriente no mayor de 800 mA a una frecuencia de 5 y 50 kHz para excitar el tejido de la rata; con otros dos electrodos se mide la respuesta del tejido con un voltaje en forma sinusoidal a la misma frecuencia que la inyectada. Conocidos los valores de las resistencias extracelular y total de agua del cuerpo se obtiene el peso de: agua total corporal, masa libre de grasa, masa grasa y agua extracelular (Salazar, 2011). Ver figuras 9 y 10.

Las ratas fueron privadas de agua una hora antes de realizada la medición, posteriormente se anestesiaron con pentobarbital según la dosis correspondiente para cada animal (50 mg/kg) de forma intraperitoneal para ser posteriormente instrumentadas con cuatro electrodos, que fueron colocados en la parte dorsal del animal de la siguiente manera:

- a) El electrodo de excitación indicado con color rojo fue colocado en la intercepción de la línea imaginaria que va de una oreja a otra, con la línea que va de la punta de la nariz hacia la base la cola.
- b) El electrodo de medición indicado de color amarillo fue colocado a una distancia de 1 cm con respecto al electrodo rojo distalmente de la cabeza.
- c) El electrodo de excitación indicado de color azul se colocó en la intercepción de la línea imaginaria que viene de la de la nariz a la cola, con la intercepción que hacen los músculos del muslo.
- d) El último electrodo de color verde fue colocado a 1 cm de distancia del electrodo de color azul, distalmente de la cola.

Las mediciones que arroja este método son: Grasa corporal (BF, por sus siglas in inglés), masa libre de masa (FFM, por sus siglas en inglés), agua extracelular (ECW, por sus siglas en inglés) y agua corporal total (TBW, por sus siglas en inglés), todas ellas proporcionadas en cantidad por gramos.

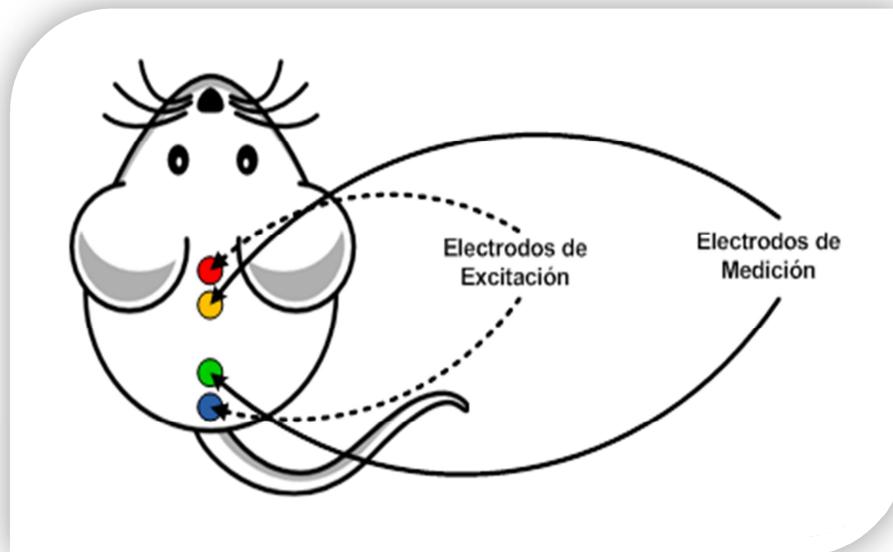


Figura 9. Modelo de implantación de electrodos en la rata para medición de bioimpedancia. Modificado de **Salazar** (2011).



Figura 10 . Sistema de registro del índice de masa corporal (IMC) y grasa visceral utilizado en este estudio.

-
- **Niveles de triglicéridos.** Se realizó por medio del instrumento Accutrend Plus y de tiras reactivas específicas. Se extrajo la sangre periférica haciendo una pequeña incisión en el último anillo de la cola de la rata. Ver figura 11.
 - **Niveles de glucosa.** Se realizó por medio de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTGI) y de tiras reactivas específicas (Larqué et. al., 2011). Esta prueba refleja la acción de la insulina secretada por la estimulación de una carga de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, además de la inhibición de la producción hepática de glucosa. El procedimiento consistió en poner a las ratas en ayuno por 16 horas, se retiró el alimento y el agua con sacarosa fue sustituida por agua simple. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital administrado de forma intraperitoneal (50 mg/kg). A los animales se les administró una solución de glucosa (2 gr de glucosa/kg de peso corporal) de manera intraperitoneal. Se tomaron muestras de sangre periférica de la cola antes de la administración de glucosa (tiempo 0), y posterior a ésta, se tomaron muestras a los 10, 20, 30, 60 y 120

minutos. Los valores de glucosa se obtuvieron mediante una tira reactiva y un glucómetro de la marca Keynote.



Figura 11. Aparatos utilizados en este trabajo para las mediciones de triglicéridos y niveles de glucosa.

o **Presión arterial.** Por medio del sistema CODA (non invasive blood pressure monitoring system por sus siglas en inglés), aparato diseñado para medir con precisión la presión sanguínea de los animales usando un sensor con tecnología VPR (Volume Pressure Recording). El software permite visualizar información en tiempo real. El procedimiento permite para obtener los niveles de presión sistólica sanguínea, presión diastólica sanguínea, frecuencia cardíaca, flujo y volumen sanguíneo. Con el fin de evitar el movimiento brusco de los animales durante la medición, así como el estrés excesivo que podría alterar los resultados de la misma, fueron habituados en un inmovilizador de acrílico en sesiones de 15 minutos diarios durante siete días. El promedio de cinco lecturas fue usado para obtener el valor de las medidas antes mencionadas (ver Figura 12).

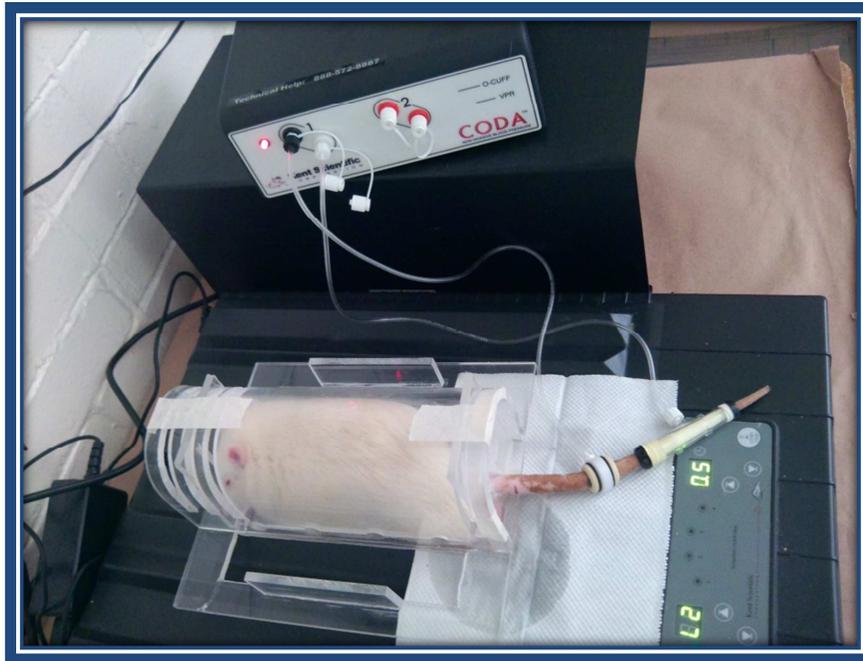


Figura 12. Estrategia de registro de la presión arterial por medio del sistema CODA utilizado en este trabajo.

7.5 Cirugía Estereotáxica

Se realizó una cirugía estereotáxica con la finalidad de administrar el activador de la vía de PKA, dibutilil-AMP cíclico vía intrahipocampal (i.h.) en la región CA1 del hipocampo. Previo a la cirugía se anestesió al animal con una mezcla de anestésicos (solución salina 6 ml, ketamina 2.5 ml, meleato de acepromazina 1 ml combinado con una solución al 2% de hidroclicloruro de xilazina 0.5 ml) en una dosis de 1 ml. Se colocó al animal en un aparato estereotáxico bajo las coordenadas a partir de Bregma; AP= -4.3 L= 2.0 mm V= 2.0 mm (Paxinos, 1997), siendo ésta la ubicación donde se perforó y colocó la cánula intracerebralmente junto con otros dos tornillos (colocados en puntos cercanos a la ubicación de la cánula) con el fin de brindar un mayor y más resistente soporte al casco. Se fijó con acrílico dental y se dejó secar totalmente. Los sujetos tuvieron de 3 a 5 días de recuperación posterior a la cirugía, inmediatamente después de este período de recuperación se comenzó las pruebas conductuales. Ver figura 13.



Figura 13. Proceso de cirugía estereotáxica realizado en el presente estudio.

7.6 Administración/Microinyección

Se realizó una vez colocada la cánula intracerebral en CA1 del hipocampo y en diferentes momentos del protocolo conductual. Primeramente se realizó la instilación de dB-AMPC durante la fase de aprendizaje, cada día al terminar el último ensayo. Después durante los primeros 3 días de la fase de reversión igualmente al terminar el último ensayo. La cantidad de sustancia y/o vehículo que se administró fue la instilación de 1 μ L a una concentración de 10 μ M de dibutiril-AMPC mediante una bomba de Microinyección a una velocidad de 1 μ L por minuto. Ver figuras 14, 15 y 16.

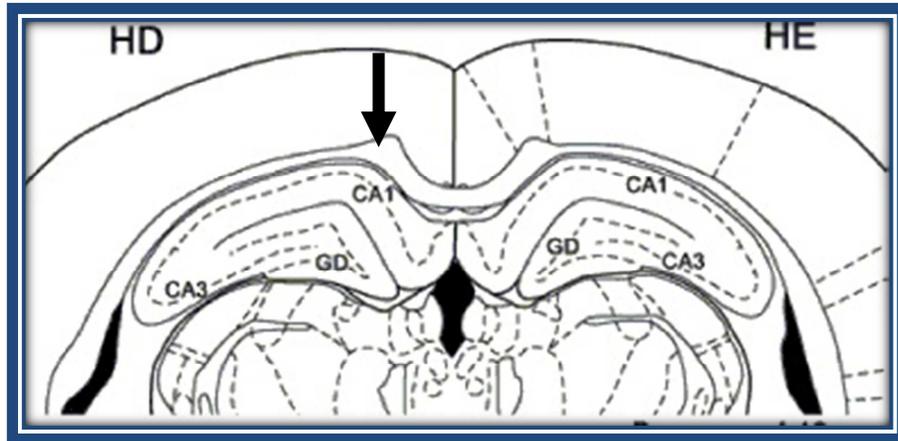


Figura 14. Fotografía que muestra la ubicación del área CA1 del hipocampo donde se colocó la cánula según las coordenadas de Paxinos. (Paxinos, 1997).

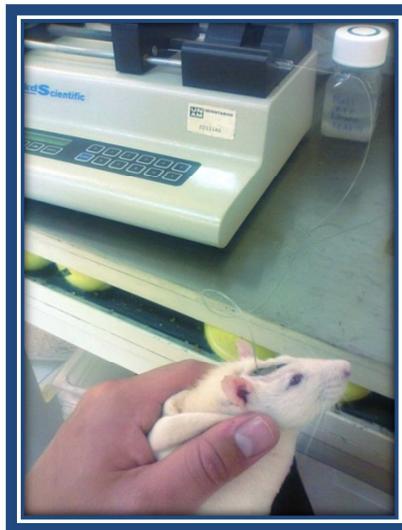


Figura 15. Proceso de Microneyección por medio de una bomba de microinfusión que permite mantener un aporte constante del fármaco y aumenta la precisión en la administración.

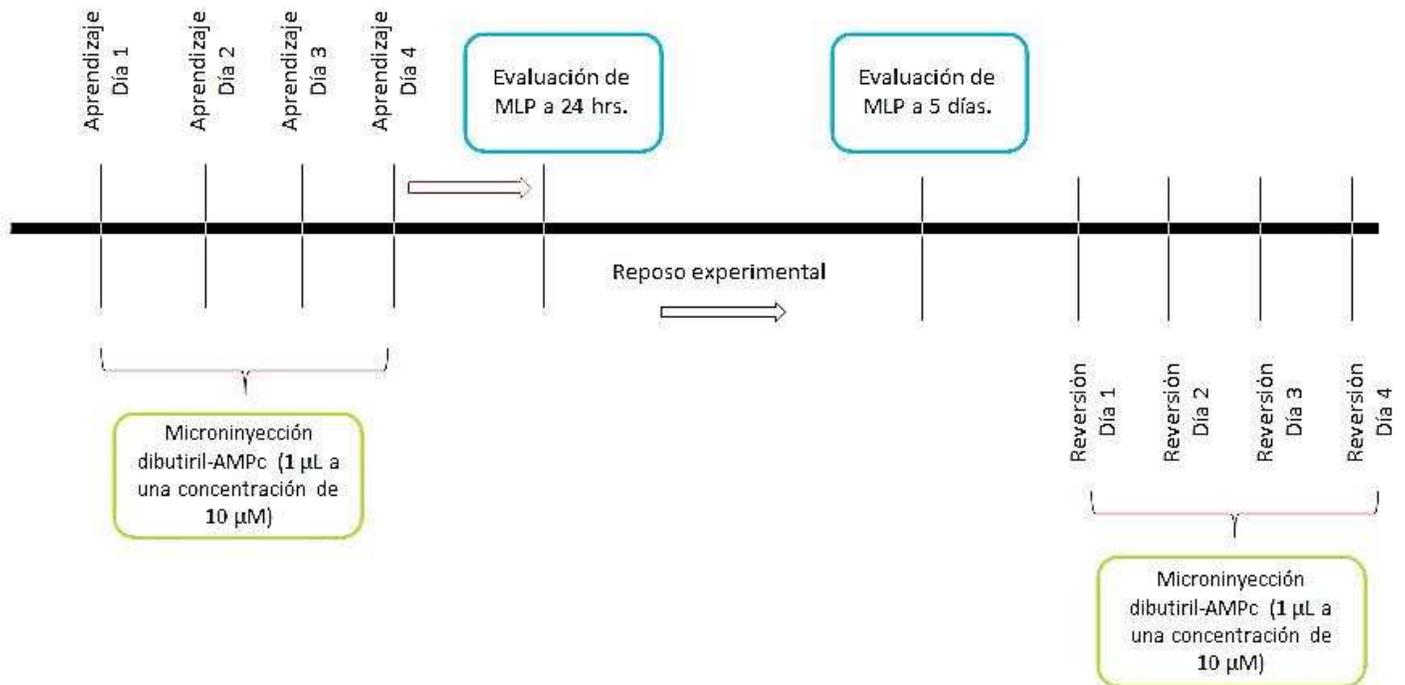


Figura 16. Diagrama representativo de la evaluación conductual y los momentos en los que se realizó la Microninyección de dB-AMPC.

7.7 Histología

Una vez concluidas las pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados para la extracción y análisis del cerebro. Se les administró una dosis letal de pentobarbital intraperitoneal para evitar el sufrimiento del animal. Posterior a esto, se perfundió al animal; primeramente se pasó una solución búfer (PB de fosfatos, PH 7.4, aproximadamente de 250-300 ml por rata). Después se perfundió solución de paraformaldehído (aproximadamente de 250-300 ml por rata). Una vez terminado de perfundir ambas soluciones se procedió a decapitar al animal para la extracción del cerebro. Éste fue almacenado en una solución de paraformaldehído al 4% (en 0.1 M fosfato salino (PBS)). Los cerebros fueron seccionados en rebanadas (corte sagital) a través de un Criostato. Posteriormente fueron teñidos utilizando la técnica de hematoxilina-eosina y fueron montados en portaobjetos para analizar y verificar la

posición de la cánula en el hipocampo derecho de la rata, específicamente en el área CA1.

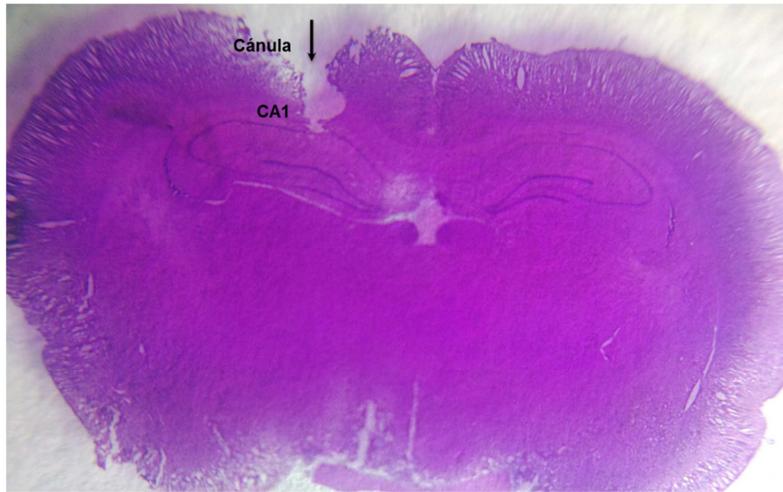


Figura 17. Posición de la cánula. Se muestra la ubicación de la cánula colocada en CA1 del hipocampo derecho. La figura representa un corte coronal del cerebro de los sujetos a los cuales se les realizó la cirugía estereotáxica, teñido con hemtaoxilina-eosina.

7.8 *Evaluación de la memoria visuoespacial*

Se tomó como modelo el laberinto diseñado por Carol Barnes en 1979 para la evaluación de aprendizaje y memoria visuoespacial, así como memoria de trabajo (O'Leary, 2012). La versión utilizada en este proyecto consistió en una plataforma circular plana de 1.22 m de ancho y color blanco, con una altura de 1.40 m, acompañado de dos focos de luz y una bocina que produce ruido blanco a una intensidad de 90 decibeles. La plataforma del laberinto contó con 18 agujeros circulares de 9.5 cm de diámetro en su periferia. Además existió una caja de escape bajo el disco con 28 cm de largo por 12 de ancho, la cual permitió escapar de la situación aversiva de este paradigma, debido a que la aplicación de una fuerte iluminación y la condición de campo abierto del laberinto, son factores que se han descrito como motivadores de huida para los roedores.

Los animales iniciaron la exploración del laberinto desde un cilindro de salida localizado en el centro de la plataforma, que fue retirado a través de un sistema de polea ubicado en el exterior del laberinto, para evitar que el experimentador participara como señal visual.

a) ***Set Experimental***

Se colocaron cortinas blancas de 1.40 m de ancho por 2.24 m de alto para formar un cuarto cuadrado dentro del cual se ubicará el Laberinto de Barnes. Dentro de este mismo cuarto se situaron dos claves visuales; un triángulo y una cruz negra a 30 centímetros de altura respecto al laberinto, equidistantes entre sí. En el techo del cuarto se instalaron 2 focos de luz blanca de 206 W; asimismo se colocó una bocina que emitirá ruido blanco con una intensidad de 90 decibeles. Tanto los focos como la bocina estuvieron colocados a 1 m de distancia respecto al laberinto y sirvieron como motivadores en la conducta de búsqueda del roedor hacia la caja de escape, además de que el ruido blanco proporcionó un control sobre el ruido ambiente natural que se pueda producir durante el experimento. El disco fue de color blanco y contó con 18 agujeros circulares (9.5 cm de diámetro). La caja de escape (28x12x8 cm) estuvo ubicada debajo de uno de los agujeros. La plataforma circular del laberinto estuvo posicionada sobre una base que permite girarla libremente 360° en un plano horizontal. Un cilindro negro de polietileno de 25 cm de diámetro fue colocado al centro del laberinto para ser levantado por medio de un sistema de poleas, y así dar inicio al ensayo (modificado de Sunyer, 2011). Además, se limpió el laberinto antes y después de cada ensayo con una solución de alcohol al 10% para evitar señales olfativas. Asimismo, se rotó la plataforma con el objetivo de mantener la ubicación del agujero al azar.

Cada ensayo fue grabado en línea a través de una cámara Microsoft HD con ayuda de una computadora para su posterior análisis.

El laberinto de Barnes utilizado para este trabajo se ilustra en la Figura 17.

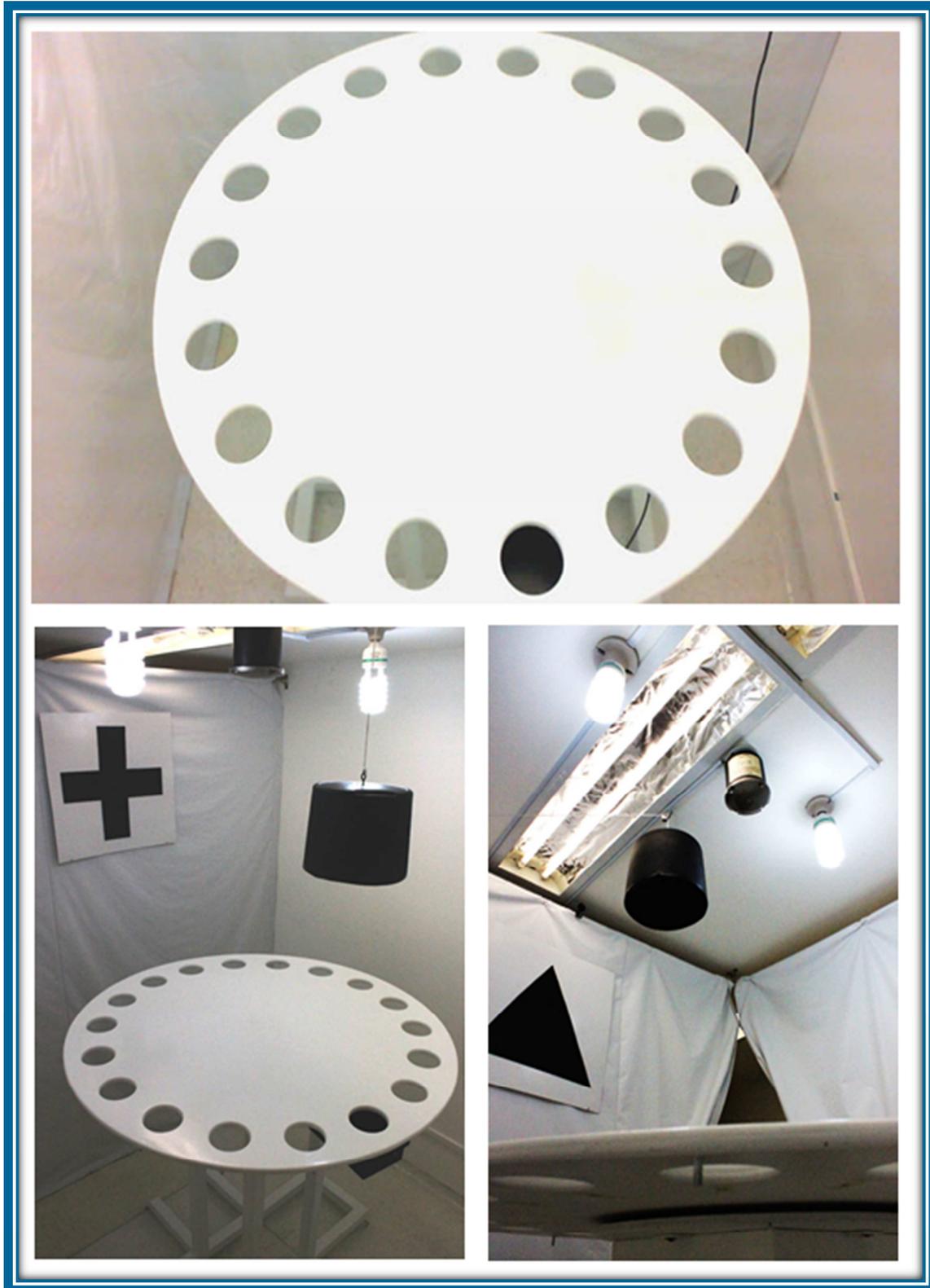


Figura 18. Laberinto de Barnes y cuarto de experimentación del laberinto utilizado en el Laboratorio de Biofísica de Membrana y Células Troncales de la Facultad de Medicina.

b) Protocolo

Período de Adaptación (Habitación). Este día tuvo como objetivo que la rata reconociera el medio experimental en el que se encuentra; que se habituara a la plataforma y sus características, que explorara sobre ella, pero sobre todo que examinara la caja de escape en la cual evita los estímulos aversivos; la luz y el ruido blanco. Cabe señalar que a cada rata se le asignó un agujero de escape particular el cual se respetó a lo largo de las fases y se mantuvo constante en todo momento.

El ensayo comenzó cuando se colocó al animal dentro del cilindro al centro del laberinto durante 10seg, posteriormente se levantó, se encendió el ruido blanco y se dejó explorar libremente a la rata durante 15 seg. Una vez transcurridos los 15 seg, el experimentador intervino para guiar de manera gentil a la rata al agujero que contiene la caja de escape. En ningún momento se forzó al animal a entrar en la caja puesto que podría haber resultado muy estresante para la rata. Una vez introducida la rata en la caja de escape, se apagó el ruido blanco y se tapó el agujero con una plataforma de PVC negro. Así se mantuvo durante 2 min y posterior a esto se dió por finalizada la habitación.

Período de Aprendizaje (Fase de entrenamiento).

Durante estos días se entrenó a la rata para que se introdujera en la caja de escape. Un ensayo comenzó introduciendo a la rata dentro del cilindro por 10 seg. Posteriormente se levantó el cilindro, al mismo tiempo que se encendió el ruido blanco y se dejó explorar libremente a la rata. El ensayo se da por finalizado al momento en el que se presentaron estas dos condiciones; 1. La rata se introdujo en la caja de escape y permanece 10 seg en ella. 2. Transcurrieron 4 minutos desde el levantamiento del cilindro y la rata no se introdujo en la caja. En este último caso el experimentador intervino y guio gentilmente a la rata hasta la caja de escape hasta que permaneciera 10 seg. En cuanto sucedió cualquiera de las dos situaciones mencionadas, el ruido blanco se apagó. La rata fue removida a su caja y así se dio por finalizado el ensayo.

Se realizaron 4 ensayos por día con un intervalo de 15 min entre ellos, este mismo orden continuó durante 4 días. Cabe recordar que tanto el laberinto como la caja de escape se limpiaron al terminar cada ensayo con alcohol al 10%. Todo lo anterior para evitar claves olfativas. Además el laberinto se rotó para omitir claves intra-laberínticas.

Evaluación de la memoria a 24 horas (90 seg).

Este ensayo tuvo como objetivo comprobar el aprendizaje de la rata, pues después de 4 días con 4 ensayos cada uno se espera que la rata haya aprendido exitosamente la ubicación del agujero que contiene la caja de escape. Para probar lo anterior se le evaluó la memoria a largo plazo en un solo ensayo de 90 segundos, 24 horas después de su último ensayo. En este ensayo no hubo caja de escape. Se colocó al animal dentro del cilindro durante 10 segundos, y una vez transcurridos estos, se levantó el cilindro y se encendió el ruido blanco. Se dejó explorar libremente a la rata dentro del laberinto. Al finalizar los 90 seg se apagó el ruido blanco y se removió a la rata a su caja. Fue un único ensayo por rata.

Período de Reposo (sin intervención experimental).

Durante 5 días no se manipuló experimentalmente a la rata.

Evaluación de la memoria a 5 días (90 seg).

Se evaluó la permanencia del aprendizaje y la memoria de la rata con la medición de la memoria a largo plazo después de un período de reposo (5 días). Se siguieron las mismas indicaciones que en la evaluación de la memoria a 24 horas.

Período de Reversión (refuerzo, invirtiendo posición 180°).

Esta fase consistió en 4 ensayos con intervalos de 15 min entre cada uno por 4 días. Durante esta fase el agujero de escape se desplazó 180° respecto de la posición que tuvo durante la fase de aprendizaje (adquisición). El procedimiento fue el mismo descrito en la fase de aprendizaje. Esta etapa se realizó con la finalidad de demostrar que las ratas habían aprendido de manera eficaz la tarea. Asimismo se comprobó que laberinto de Barnes es una prueba válida para el aprendizaje y la memoria visuoespacial.

En la tabla 2 se resume el protocolo utilizado para la prueba de Laberinto de Barnes (Sunyer, 2011; O’Leary, 2012).

Día	Procesos
1	Habitación
2-5	Aprendizaje (Fase de entrenamiento)
6	Ensayo de evaluación de memoria a largo plazo (a 24 horas) (90 seg.)
7-11	Periodo de reposo (Sin intervención experimental)
12	Evaluación memoria a largo plazo a 5 días (90 seg.)
13 – 17	Periodo de reversión (refuerzo, invirtiendo posición 180°)

Tabla 2. Resumen de las diferentes fases del protocolo de Barnes que se utilizó (modificado de Sunyer 2011).

c) Mediciones

Tanto en la fase de aprendizaje como en la de reversión fueron medidos los siguientes parámetros.

- Errores primarios. Número de veces que la rata introduce su cabeza en un agujero incorrecto hasta encontrar por primera vez el objetivo.
- Errores totales. Número de veces que la rata introduce su cabeza en un agujero incorrecto, desde que inicia el experimento hasta que finaliza por cualquiera de las dos formas, ya sea que trascurren 4 minutos sin que la rata encuentre la caja de escape o que la encuentre y permanezca 10 segundos dentro de ella.
- Latencia primaria. Tiempo que transcurre desde que se inicia el experimento hasta el primer encuentro con el objetivo.
- Latencia total. Tiempo que transcurre desde que inicia el experimento hasta que finaliza por cualquiera de las dos formas mencionadas.

Por otro lado, en la evaluación de la memoria a largo plazo para ambos tiempos (24 horas y 5 días después), se contabilizó el número de veces que la rata introdujo la cabeza en el agujero donde le correspondía la caja de escape. Asimismo se contabilizó las veces que ésta introdujo su cabeza en los 2 agujeros contiguos a su agujero de referencia, tanto a la izquierda como a la derecha. Se sumaron ambas mediciones y obtuvieron porcentajes por grupo para su posterior análisis estadístico.

7.9 Análisis Estadístico

Los datos son reportados como el promedio. La “*n*” indica el número de animales considerados en la muestra. Los resultados obtenidos se analizaron con las pruebas estadísticas *t* de student para muestras independientes, ANOVA mixto y ANOVA de dos vías según el caso. Se realizó la prueba *post hoc* de Tukey (HDS). El valor estadístico de significancia para *p* es < 0.05 . Se utilizaron los siguientes paquetes estadísticos para realizar estas pruebas: SPSS Inc., versión 20 y Origin Lab versión 8.0 para Windows.

VIII. RESULTADOS

En este trabajo la sección de resultados fue ordenada partiendo del hallazgo esencial del mismo (evaluación de la memoria a 24 horas). Posteriormente se muestran los resultados obtenidos de diversas mediciones metabólicas. Éstas fueron realizadas con el fin de estimar el estado de diversos componentes del SM y, de esta manera, sustentar que la dieta alta en sacarosa generó cambios a este nivel entre el grupo que se sometió a la dieta alta en carbohidratos (grupo Tx) comparada con el grupo control. Posterior a estas mediciones, y una vez comprobada la instalación del SM en el grupo con la dieta alta en carbohidratos, se continuó con la segunda parte de los resultados, que se enfocó a explorar los posibles cambios cognitivos entre los diferentes grupos, considerando las dos variables determinantes en este trabajo; la dieta (animales con SM) y la administración de dB-AMPC (animales a los que se les activó la vía de PKA por medio de dB-AMPC).

Bajo estas condiciones mencionadas y por medio de un paradigma conductual se comprobó que después de mostrar que las ratas tuvieron alteraciones a nivel metabólico. Existieron consecuencias a nivel cognitivo en los grupos que cursaron con SM, además, aunado a lo anterior, se evaluó y comparó si existían diferencias entre los animales con SM y los animales con SM a los cuales se les administró el dB-AMPC como posible componente para contrarrestar o mejorar la tarea cognitiva (memoria visuoespacial) claramente comprometida por el SM. Se hace énfasis en que la administración del dB-AMPC, y su efecto en los animales con SM, parten como el principal foco de atención en este trabajo.

El primer aspecto que se analizó fue la evaluación de la memoria a 24 horas del último ensayo de la fase de aprendizaje en el laberinto de Barnes. Se hace énfasis en las diferencias entre el grupo SM con el grupo SM+dB-AMPC y el grupo dB-AMPC.

Memoria de Largo Plazo (MLP) a 24 horas.

La evaluación de la MLP es una medición que se utiliza para reconocer la eficacia en la retención de la memoria y en su mejoramiento dentro de un contexto visuoespacial.

Con el propósito de determinar si el incremento artificial de los niveles de AMPc en el interior de la célula mejora el desempeño de la MLP, se calculó el porcentaje de aciertos obtenidos en 5 grupos (Control, SM, SM+dB-AMPc, dB-AMPc, Vehículo).

Cada acierto se cuantificó al contar las veces que el sujeto acertó en el agujero en el que previamente aprendió que se situaba su caja de escape, por lo que a menor número de aciertos, menor retención y a mayor número de aciertos mayor retención. Esta evaluación fue realizada al inicio a las 12 semanas de tratamiento (ver Figura 18).

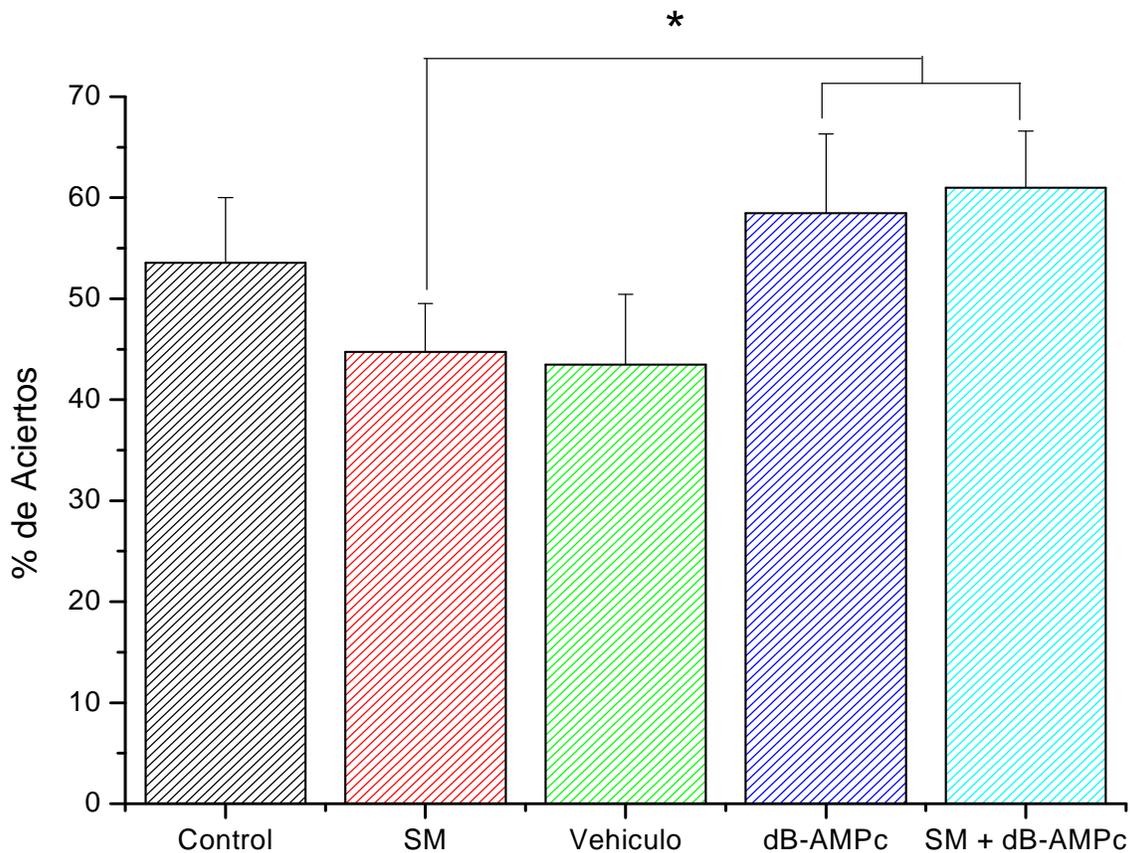


Figura 19. MLP a 24 horas. Gráfica que muestra el porcentaje de aciertos en la evaluación de la memoria 24 horas después del último ensayo en el laberinto de Barnes. Se muestra que el grupo dB-AMPC obtuvo el mayor porcentaje de aciertos. Los datos representan el promedio \pm ES, la estadística es obtenida con ANOVA de dos vías. Control ($n=8$), SM ($n=10$), SM+dB-AMPC ($n=8$), dB-AMPC ($n=9$), Vehículo ($n=6$), $*p < 0.05$.

Los resultados de la figura muestran los promedios de los porcentajes de aciertos de cada grupo. Se observa que el grupo control obtuvo un promedio de 53.56% \pm 6.4, por su parte, el promedio del grupo con SM fue de 44.72% \pm 4.8, el grupo experimental SM+dB-AMPC obtuvo un promedio de 60.98% \pm 5.5, mientras que en el grupo manipulado únicamente con dB-AMPC fue de 58.46 % \pm 7.8 de aciertos. Finalmente, el grupo vehículo obtuvo un promedio final de 43.49% \pm 6.9 de aciertos.

Los grupos a los que se les administró dB-AMPC (grupo SM+dB-AMPC y grupo dB-AMPC) obtuvieron un porcentaje sobresalientemente mayor que el resto de los

grupos, siendo la comparación directa con el grupo SM la más notoria y relevante para este estudio. Ésta diferencia fue estadísticamente significativa $F(1.371, 1.278) = 33.69$; $p < 0.05$. Esto concuerda con la hipótesis planteada al inicio, donde se esperaba un aumento en la eficacia en la memoria visuoespacial y la MLP, debido a la acción del dB-AMPC en la vía de PKA, actuando como un activador que fortalece cascadas de señalización, fosforilación de proteínas y circuitos moleculares subyacentes a la memoria y permanencia de ésta.

De esta forma, los resultados de la figura 19 muestra que a nivel cognitivo existen diferencias en la eficacia de la retención de la MLP entre los diferentes grupos. Se hace énfasis en el mal desempeño de la tarea por parte del grupo SM, como consecuencia de la dieta alta en carbohidratos. Por otro lado, se observa un mejor desempeño de la tarea del grupo con SM+dB-AMPC, lo que sugiere un mejoramiento de la tarea como consecuencia de la acción del dB-AMPC en el circuito de la MLP y el LTP. Asimismo, el grupo dB-AMPC obtuvo un porcentaje similar al SM+db-AMPC, siendo su promedio mayor que el grupo control.

Estas diferencias permiten sugerir una mejora en la memoria visuoespacial y en la MLP (a 24 horas), independiente de la condición inicial (SM o control), debido a la acción del dB-AMPC en el sitio de acción subyacente a este proceso.

Ingesta de sacarosa y alimento

Con el fin de determinar si el tratamiento alto en sacarosa modificó el consumo de alimento y agua en los grupos tratados, se cuantificaron ambos parámetros en dos grupos (Control y tratado, Tx) a lo largo de once semanas de tratamiento. Ambos grupos iniciaron esta medición a las 8 semanas de edad y concluyeron a las 16 semanas. El acceso al agua con azúcar por parte del grupo Tx empezó también a las 8 semanas de edad.

En la Figura 19 se muestra el promedio del consumo de agua (grupo control) y agua al 20% de sacarosa (grupo Tx) por semana, durante las 11 semanas que se evaluó

este parámetro. Los valores obtenidos en el grupo tratado, 3522.13 ± 3.3 ml, son claramente mayores respecto al control que obtuvo un promedio de 1175.62 ± 3.5 ml. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística T de Student, en las que se obtuvo una diferencia significativa con una $t(2) = 7.83$ $p < 0.05$.

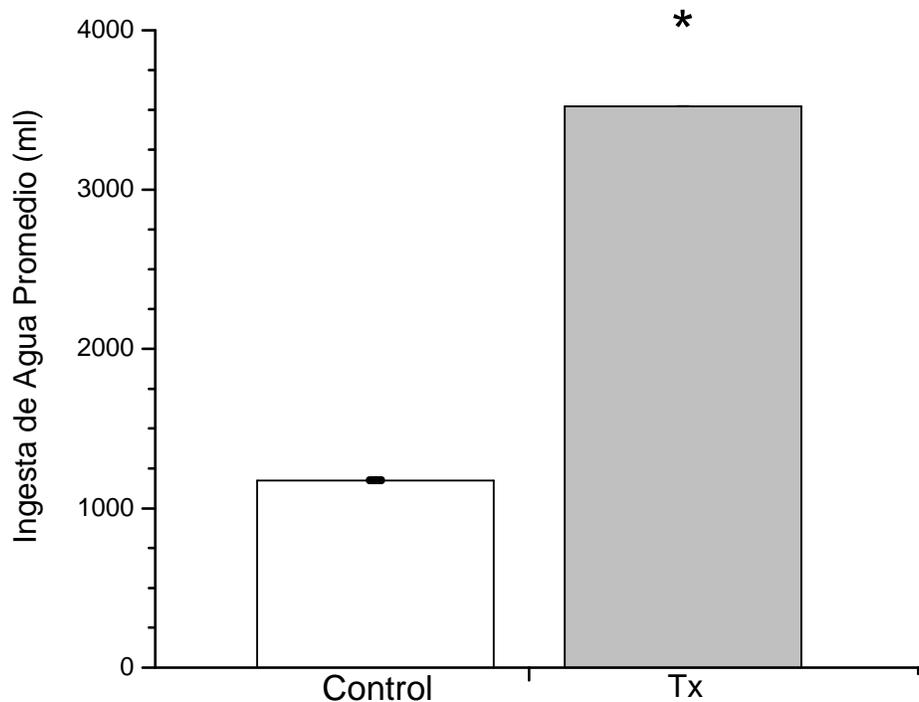


Figura 20. Ingesta de Agua. Gráfica que muestra el consumo promedio \pm ES de agua por semana, durante 11 semanas obtenidos con T de Student. Control con agua ($n=8$), Tx, agua al 20% de sacarosa ($n=24$), $*p < 0.05$.

Literatura relacionada al tema, reporta un mayor consumo de sacarosa en los sujetos tratados respecto de los controles, sugiriendo que en los tratados se ven alteradas las señales de saciedad del organismo, lo cual provoca una conducta adictiva hacia el sabor dulce de la sacarosa (Larqué et. al., 2011). Esta conducta los conduce a ingerir en mayor proporción y constancia el agua dulce al 20% de sacarosa proporcionada, modificando una serie de mecanismos homeostáticos

intrínsecos al organismo, para así compensar el consumo de carbohidratos, grasas y proteínas que el sujeto está procesando.

Los resultados obtenidos en esta medición coinciden con los reportados el grupo de Larqué et. al. En 2011. Se observó un mayor consumo de agua en los animales que fueron sometidos al tratamiento de agua al 20% de sacarosa.

Analizando los resultados en el consumo de sacarosa, la siguiente pregunta que surgió fue saber cómo era el consumo de alimento en los sujetos que tuvieron una dieta alta en sacarosa y si es que estos datos se relacionaban de alguna forma con los sujetos que mejoraron la memoria como consecuencia de los niveles de AMPc; este parámetro también fue medido en el grupo control y el grupo tx a lo largo de 11 semanas.

La Figura 20 muestra el promedio de ingesta de alimento por semana, durante las 11 semanas que se evaluó este parámetro. Se puede observar que el promedio del grupo control fue de 605.28 ± 1.9 g, mientras que el grupo tratado obtuvo un promedio de 270.29 ± 0.9 g. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística T de Student, en las que se obtuvo una diferencia significativa con una p $t(4) = 8.87 < 0.05$.

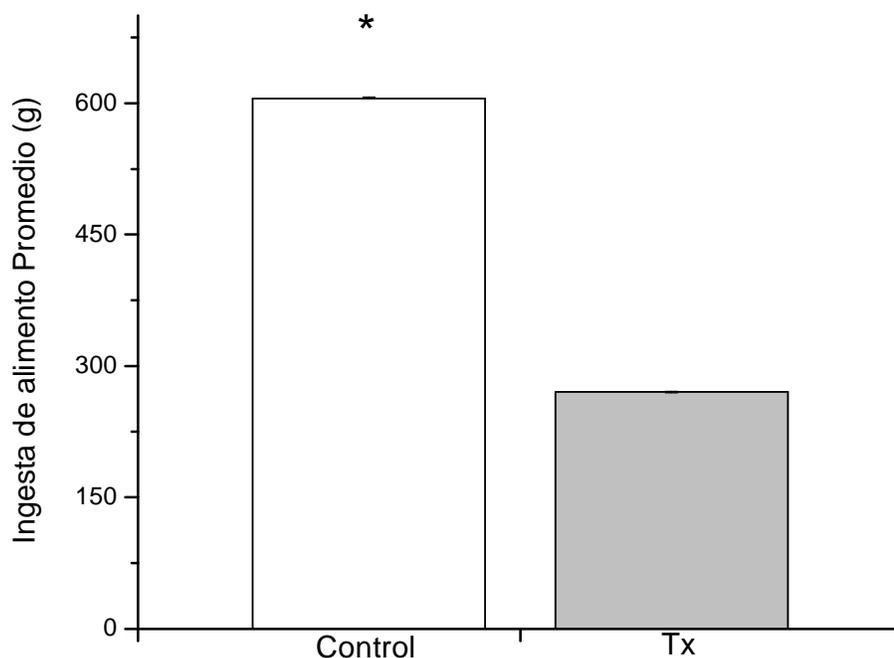


Figura 21. Ingesta de Alimento. Gráfica que muestra el consumo promedio \pm ES de ingesta de alimento por semana, durante 11 semanas obtenidos con T de Student. Control ($n=8$), SM ($n=24$), $*p < 0.05$.

Esta observación es consistente con el hecho de que los animales en condiciones de dieta con sacarosa (20% p/v) reducen su ingesta de alimento. Asimismo, dicha observación abrió la posibilidad de que el consumo de agua estuviese cambiando en las mismas condiciones y que esto lleve a presentar un bajo consumo de alimento.

Una vez que se observaron diferencias significativas en el consume de sacarosa y en la ingesta de alimento, nos interesamos en saber si estas diferencias en el consumo influían en el incremento de peso total de los sujetos a lo largo de 13 semanas.

Peso Corporal

Con el propósito de conocer si existieron diferencias en el incremento de peso como consecuencia de la ingesta de sacarosa, se calculó el peso corporal total de los sujetos control comparado con los de ingesta de sacarosa.

El peso como criterio de inclusión del SM resulta no ser constante en el 100% de los casos en los que se presenta este síndrome, puesto que el sujeto puede o no presentar obesidad central y aun así tener SM si es que cumplió con otros 3 criterios establecidos por la ATP III para que se diagnosticara como SM (Larqué et. al., 2011).

En la Figura 21 se muestran los valores obtenidos de esta medición que se realizó a lo largo de 13 semanas. El grupo control obtuvo un promedio de 188.9 ± 9.3 g.; mientras que el grupo tratado con sacarosa obtuvo 188.08 ± 13.05 g. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba T de Student, la cual no arrojó diferencias significativas.

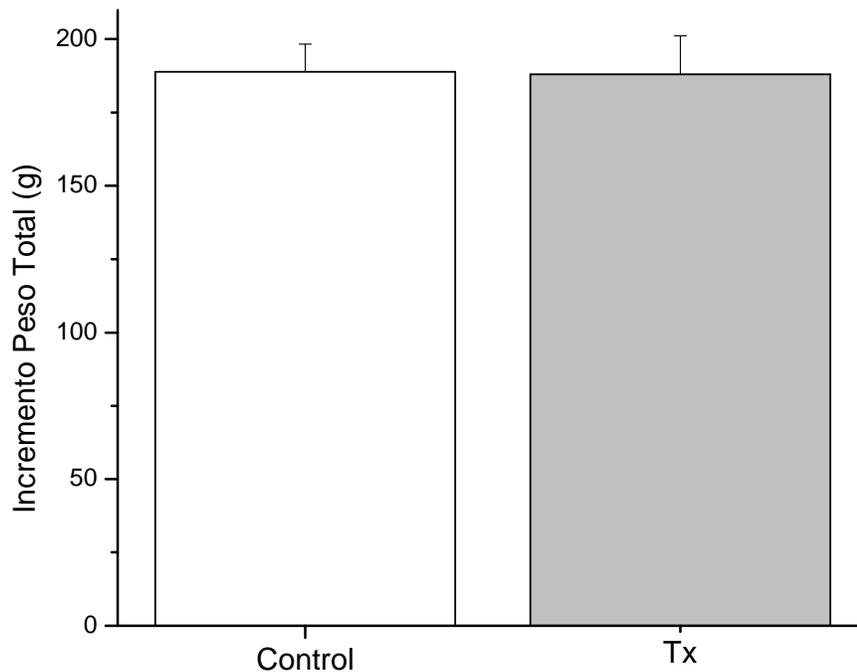


Figura 22. Masa Corporal. Gráfica que muestra el promedio \pm ES del incremento de la masa corporal total durante 13 semanas obtenido con T de Student. Control (n=8), SM (n=24), * $p < 0.05$.

Si bien el consumo de sacarosa fue notablemente mayor en el grupo tratado, esto no trajo como consecuencia un incremento gradual o diferente del peso respecto a los sujetos control. Como se sugiere anteriormente, las ratas poseen un control

homeostático muy poderoso el cuál es difícil de romper. Esto podría explicar el por qué el consumo de sacarosa no causó diferencias entre ambos grupos en la medición del incremento total de los sujetos.

Una vez que se observó que no existían diferencias en el peso entre los grupos el estudio requería saber con mayor detalle cómo es que está conformada la composición corporal de los sujetos.

Composición Corporal

Con el objetivo de conocer los valores de grasa y agua existentes en los organismos, se midió la proporción de este componente en el grupo control y el grupo Tx. Esta evaluación se realizó a la semana 11 de tratamiento. Las mediciones fueron obtenidas por la técnica de bioimpedancia, útil para estimar la composición corporal de un organismo *in vivo*.

La Figura 22 muestra los valores obtenidos de la medición; los valores del grupo control fueron: grasa corporal (BF) 169.21 ± 4.9 g, masa libre de grasa (FFM) 231.9 ± 3.1 , agua extracelular (ECW) 66.63 ± 2 g, y agua corporal total (TBW) 222.87 ± 7.6 g. Por su parte el grupo tratado con el 20% de sacarosa (tx) obtuvo los siguientes valores: grasa corporal (BF) 201.0 ± 7.1 g, masa libre de grasa (FFM) 254.43 ± 5 g, agua extracelular (ECW) 78.95 ± 3 g y agua corporal total (TBW) 264.31 ± 11.1 g., , donde solamente el parámetro de BF y TBW fueron significativos en grupo tratado respecto al control $t(30) = -2.48$ $p < 0.05$ $p < 0.05$.

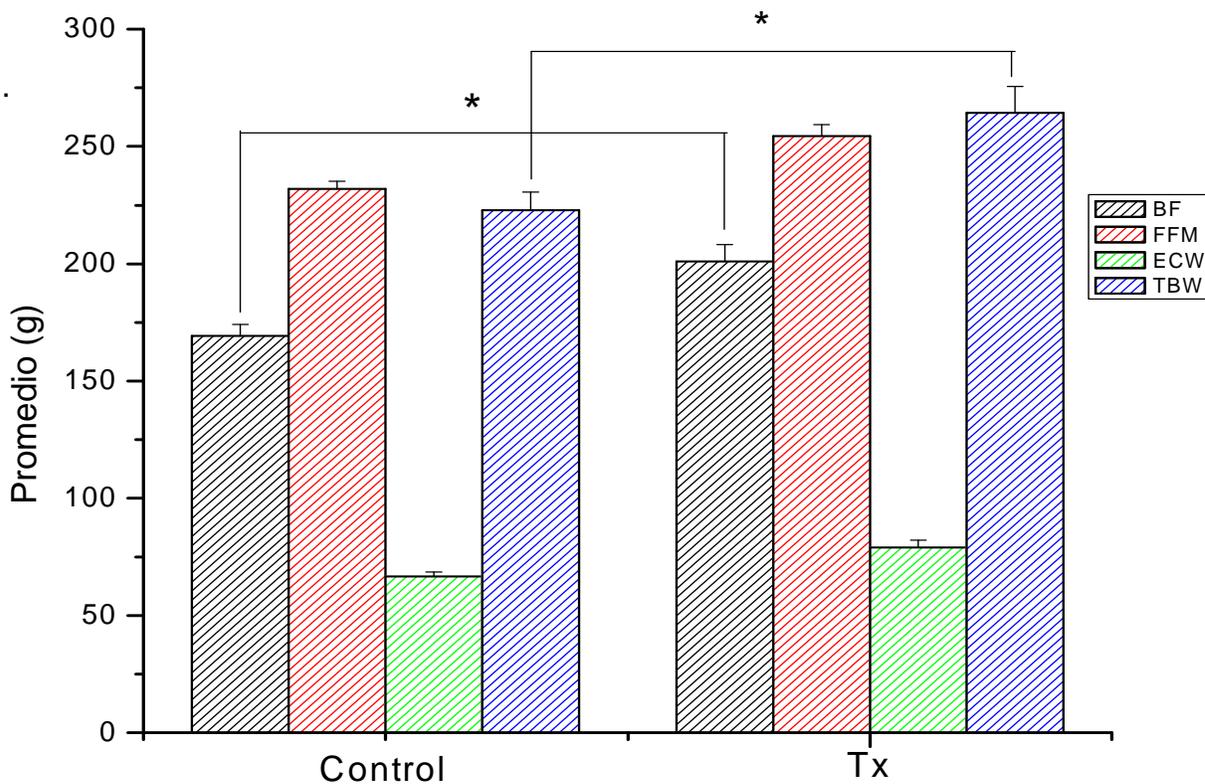


Figura 23. Composición Corporal. Gráfica que muestra la composición corporal a las 12 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con T de Student. BF, Grasa Corporal; FFM, Masa Libre de Grasa; ECW, Agua Extracelular; TBW, Agua Corporal Total. Control (n=8), Tx (n=24), *p < 0.05.

Se puede observar una diferencia estadísticamente significativa en la grasa corporal (BF) y el agua corporal total (TBW). Esto correlaciona con el hecho de que a pesar de que las ratas no incrementaron su peso total, los valores de la composición corporal si difieren entre ambos grupos (control y Tx); lo anterior como consecuencia del incremento en el consumo de sacarosa, lo que traería como consecuencia un mayor consumo de carbohidratos acorde con lo esperado, y a su vez esto conllevaría a un incremento en el tejido magro, reflejándose una mayor grasa corporal en los sujetos tratados con sacarosa al 20%.

Una vez observadas estas diferencias en la composición corporal, fue necesario conocer cómo eran los niveles de triglicéridos en los sujetos con dieta alta en

sacarosa y si éste podía ser un parámetro de identificación para el diagnóstico de SM en nuestros sujetos con dicha dieta.

Nivel de triglicéridos

Con el propósito de identificar los parámetros metabólicos divergentes entre los sujetos sometidos a una dieta alta en carbohidratos y los sujetos control, se midieron los niveles de triglicéridos (mg/dL) de ambos grupos para posteriormente comparar los resultados y determinar si existen diferencias significativas en los niveles obtenidos. Los valores fueron analizados con la prueba estadística T de Student ($p < 0.05$). La Figura 23 muestra los valores de concentración de este lípido a las 11 semanas de tratamiento. Se observa que el grupo control obtuvo un promedio de 145.25 ± 14 mg/dL, mientras que el grupo tratado obtuvo un promedio de 236.09 ± 16.5 mg/dL, $t(24) = -3.73$, $p < 0.05$. Estos resultados fueron significativos ($p < 0.05$).

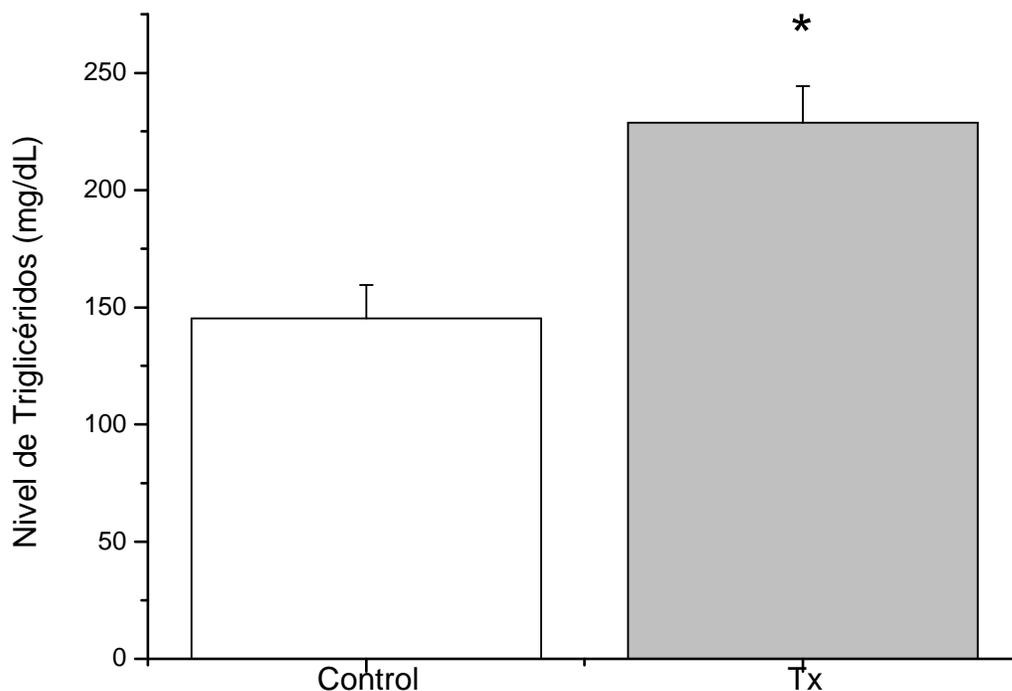


Figura 24. Triglicéridos. Gráfica que muestra el nivel de triglicéridos a las 11 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con T de Student. Control ($n=8$), Tx ($n=24$), $*p < 0.05$.

Dado que otro de los criterios para el diagnóstico de SM es la hipertensión arterial, se buscó explorar los cambios la presión arterial sistólica y diastólica, para medir si existían cambios a este nivel en las ratas tratadas con dieta alta en carbohidratos.

Presión arterial

Con el propósito de identificar los parámetros metabólicos divergentes entre los sujetos sometidos a una dieta alta en carbohidratos y los sujetos control, se midieron los niveles de presión arterial (mm Hg) de ambos grupos para posteriormente comparar los resultados y determinar si existen diferencias en los niveles obtenidos. Los valores fueron analizados mediante la prueba estadística T de Student ($p < 0.05$). La Figura 24 muestra los promedios obtenidos en esta medición. El grupo control obtuvo un promedio de 113.1 ± 4.6 mm Hg de presión sistólica y 76.87 ± 3.7 mm Hg de presión diastólica, mientras que los promedios del grupo tratado fueron 128.89 ± 13.07 mm Hg de presión sistólica y 98.04 ± 5.53 mm Hg de presión diastólica, (sístole $t(17) = -1.77$ y diástole $t(17) = -0.34$, $p < 0.05$). Estos resultados fueron significativos ($p < 0.05$).

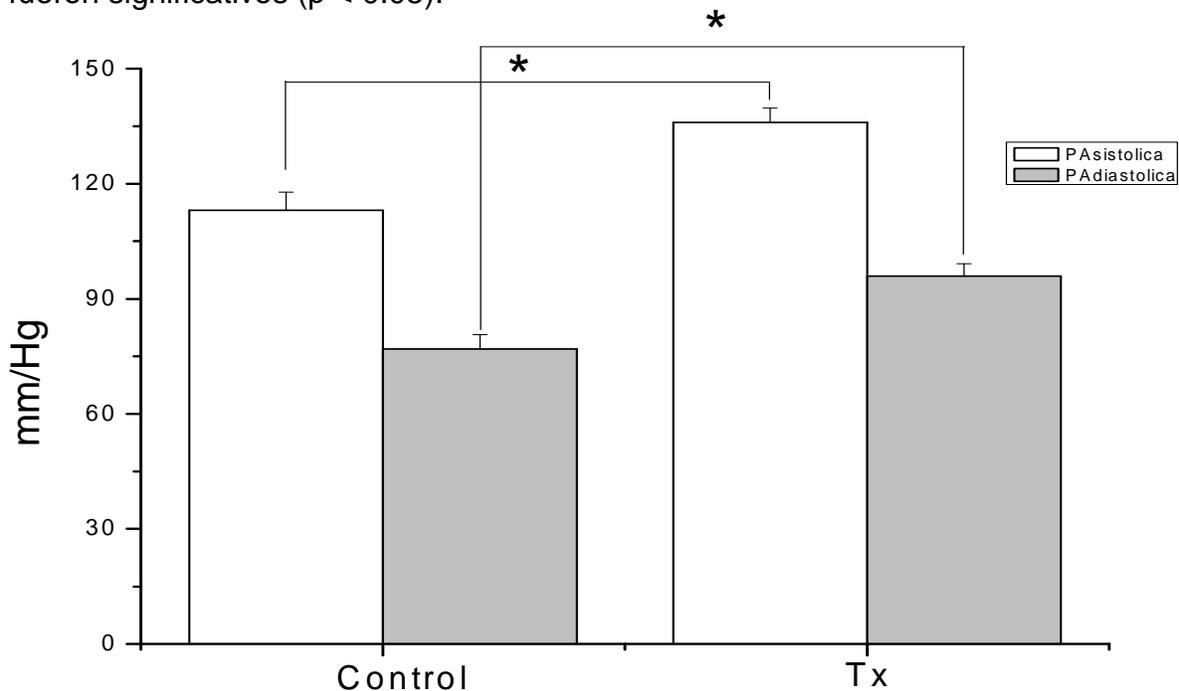


Figura 25. Presión Arterial. Gráfica que muestra los valores de presión arterial sistólica y diastólica a las 11 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los valores se presentan en unidades de milímetros de mercurio (mmHg). Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con una T de student para muestras independientes. Control ($n=8$), Tx ($n=24$). $*p < 0.05$.

Evidencia experimental reporta que los niveles de insulina se encuentran alterados en los sujetos con SM y diabetes tipo II. Esto lleva a una mayor resistencia a la insulina, lo que desencadena un desbalance en el control de los niveles de presión arterial (Larqué et. al., 2011). Estos datos acerca de la presión arterial coinciden con los resultados obtenidos en la medición realizada (figura 24).

Se sabe que una dieta alta en calorías conduce a varias complicaciones metabólicas en el sujeto. Otra alteración importante es la tolerancia de glucosa en el organismo. Es por eso que fue necesario medir la curva de tolerancia a la glucosa en los sujetos sometidos a una dieta alta en carbohidratos y saber si estos sujetos presentan intolerancia a glucosa según parámetros de diagnóstico del SM.

Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal

A fin de correlacionar los datos metabólicos previamente obtenidos (presión arterial y nivel de triglicéridos) y definir en conjunto los parámetros necesarios para establecer la instalación del SM a los sujetos a los que se les implementó una dieta alta en carbohidratos a base de sacarosa al 20% según los criterio del ATP III, se midió la curva de tolerancia a la glucosa (PTGI) para evaluar si existen diferencias entre ambos grupos.

La Figura 25 muestra el promedio de la concentración de glucosa en los organismos durante el curso temporal de la prueba a diferentes tiempos (0 min registro basal, a 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, y 120 min después de haberse inyectado la glucosa dentro del organismo). Estos valores fueron analizados por medio de ANOVA mixto

El valor basal del grupo control fue discretamente más elevado (155.3 ± 17.4 mg/dL) comparado con el grupo tratado (147.53 ± 5.4 mg/dL). El máximo punto glucémico en el grupo tratado fue observado a los 60 minutos con un valor de 297.96 ± 17.5 mg/dL, mientras que en el grupo control su máximo punto glucémico fue observado en el minuto 30 con un valor de 276.33 ± 56.4 mg/dL. Esta medición reveló diferencias significativas entre ambos grupos en las mediciones a los 60 y 120 minutos de la inyección de la glucosa $F (.184, 3.98) = 122.67$ $p < 0.05$.

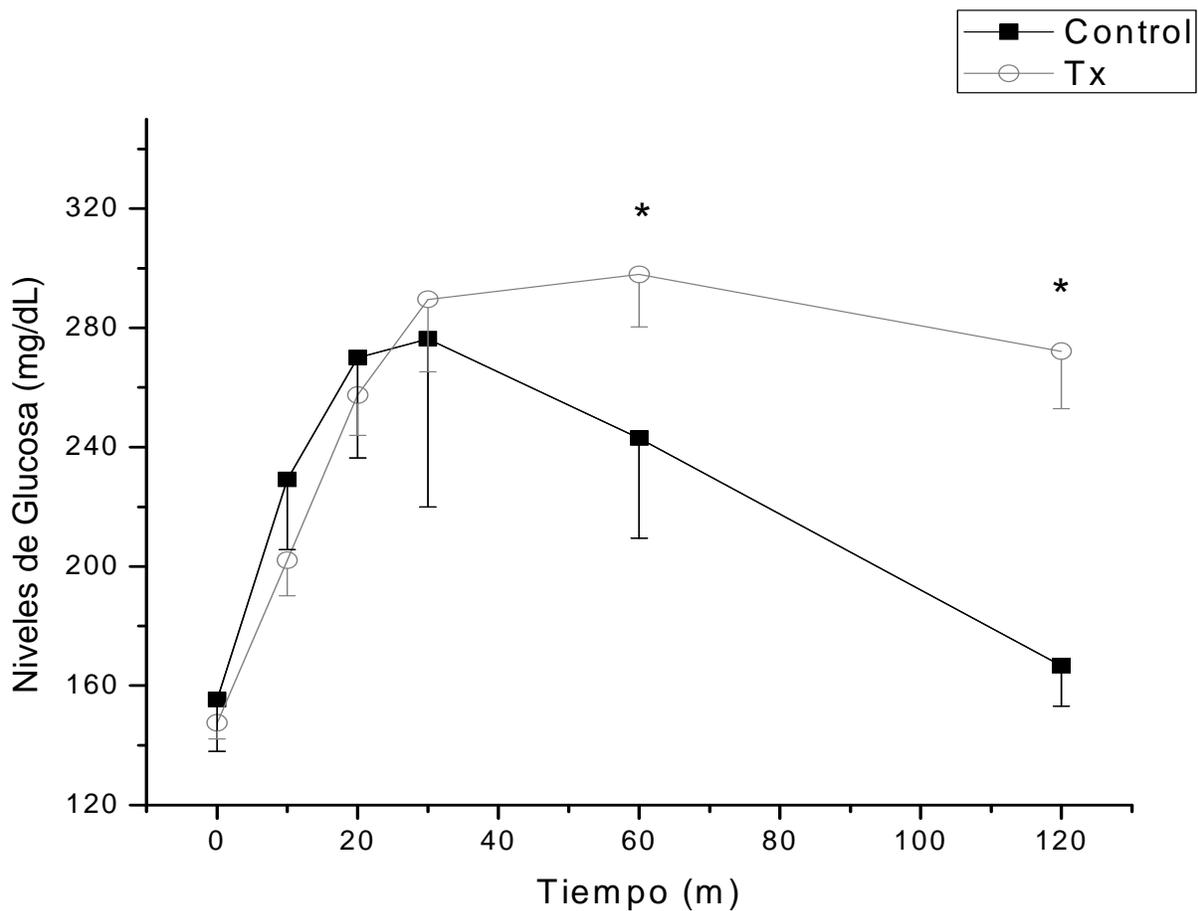


Figura 26. Curva de Tolerancia a la Glucosa. Gráfica que muestra los niveles de glucosa en la sangre a las 11 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con una ANOVA Mixto. Control ($n=8$), SM ($n=24$), $*p < 0.05$.

En la figura se observa que los niveles de glucosa en un inicio son ligeramente más altos en el grupo control, sin embargo, conforme el tiempo de aclaramiento transcurre, son los niveles del grupo tratado los que continúan incrementando hasta su pico máximo al minuto 60. Con esto se observa también que el comportamiento cinético es diferente en ambos grupos.

Los datos obtenidos han sido asociados con el consumo de sacarosa en la dieta del grupo tratado, la cual produce incrementos en los niveles de glucosa en sangre provocando una mayor dificultad para absorber o aclarar el organismo de este carbohidrato.

Resumiendo hasta aquí los resultados obtenidos y estadísticamente analizados, se establece que del total de las evaluaciones metabólicas realizadas en ambos grupos (grupo con dieta alta en carbohidratos y grupo control), se observaron cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$) en la cuantificación del nivel de triglicéridos, así como en el parámetro de presión arterial (diastólica y sistólica) y del incremento en los niveles de glucosa. Asimismo se observó una diferencia significativa en la cantidad total en gramos de la masa magra, sumada a la tendencia de aumento dentro de los demás elementos evaluados en la composición corporal de los sujetos tratados con la dieta alta en sacarosa sin que estos fueran significativos ($p < 0.05$).

En conjunto, estas mediciones revelan que el grupo tratado con sacarosa, presenta al finalizar 11 semanas de tratamiento los tres criterios de diagnóstico necesarios para SM (Grundy, 2004), por lo tanto, se puede concluir que las ratas en tratamiento cursan con el SM a las 11 semanas. Una vez confirmado que nuestros grupos con tratamiento desarrollaron SM, se procedió a realizar la evaluación cognitiva del aprendizaje y la memoria, mediante el Laberinto de Barnes. Como ya se mencionó, las ratas tratadas presentaron un decremento en la eficacia de la ejecución de la tarea de memoria visuoespacial (Figura 18). Por otro lado, uno de los hallazgos más notables en la misma gráfica es el que el grupo con SM al cual se le activó el sistema de PKA por medio del activador db-AMPC, obtuvo el mayor porcentaje, de la misma forma que el grupo control con db-AMPC. Este hallazgo es sin duda relevante

para este trabajo. A continuación se plantea el seguimiento de esta evaluación conductual con sus respectivos parámetros evaluados.

Resultados de la evaluación cognitiva

Los organismos mantienen de forma inherente un fuerte mecanismo de homeostasis que les permite adaptarse a casi cualquier contexto y exigencias del medio en que se encuentren. Sin embargo cuando este organismo se ve comprometido por alguna enfermedad, padecimiento o alteración, el equilibrio existente entra en un descontrol en el funcionamiento del organismo a varios niveles, tanto a nivel metabólico, desencadenando diversos factores de riesgo que predisponen al desarrollo de otras enfermedades, como en alteraciones en el sistema nervioso, que conlleva como consecuencia problemas y/o cambios cognitivos. Tal es el caso del SM, que debido a las alteraciones metabólicas inherentes a este padecimiento, produce cambios generalmente negativos en procesos cognitivos.

Es por eso que es importante conocer las alteraciones cognitivas que se generan como consecuencia del SM; por esta razón, las siguientes mediciones efectuadas se realizaron con el objetivo de explorar cambios de orden conductual en las ratas con tratamiento de sacarosa (20% p/v), y que desarrollan posteriormente SM.

Se evaluó aprendizaje y memoria en el laberinto de Barnes, la duración del protocolo fue de 17 días, por lo que se inició a la doceava semana de tratamiento con sacarosa en el grupo tratado y finalizando en el inicio de la semana 14.

Se evaluaron cuatro parámetros (errores primarios, errores totales, latencia primaria y latencia total), que permitieron cuantificar dos parámetros conductuales; el aprendizaje y la memoria.

Errores Primarios

Con el objetivo de conocer el número de errores primarios que cometió cada uno de los sujetos experimentales, se cuantificó el número de agujeros visitados por la rata antes de encontrarse por primera vez con su agujero de escape durante cada ensayo. Cada ensayo estuvo conformado por cuatro sesiones de 15 minutos. El

número de errores que cometieron los sujetos experimentales, nos permite evaluar si existe aprendizaje y memoria, ya que conforme los ensayos y la exposición a la resolución de la tarea del laberinto avanza, el número de errores cometidos debe disminuir en condiciones normales.

En la Figura 27 se muestra el curso temporal de los ensayo durante la ejecución de la tarea del laberinto de Barnes, tanto de la fase de adquisición como de la fase de reversión de los grupos control, SM, SM + dB-AMPC y dB-AMPC. Durante la fase de aprendizaje el curso temporal de todos los grupos fue de disminuir el número de errores, obteniendo así una curva de aprendizaje. Esta misma tendencia se mantuvo en la fase de reversión para todos los grupos evaluados.

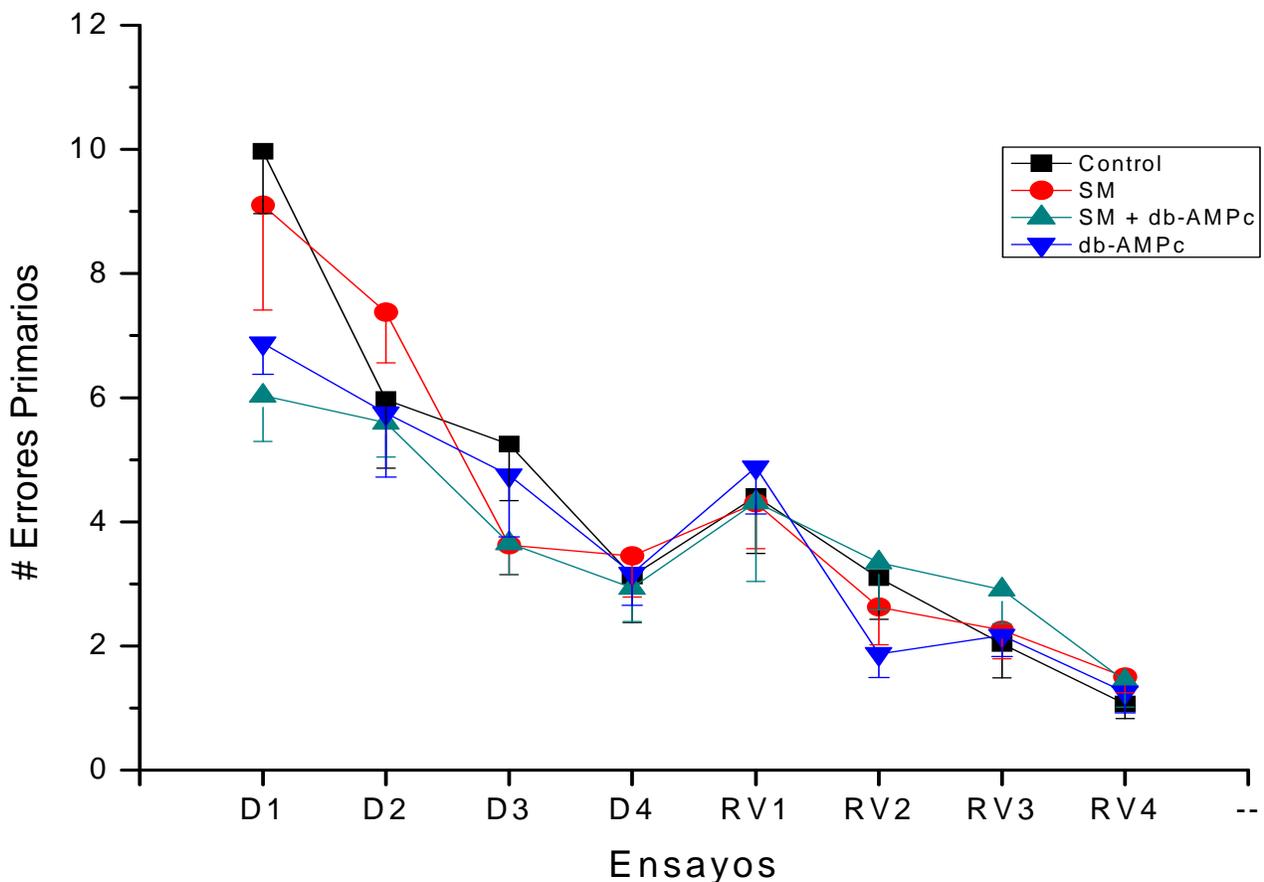


Figura 27. Errores Primarios. Gráfica que muestra los errores primarios con el Laberinto de Barnes a las 12 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con una ANOVA mixto. Control ($n=8$), SM ($n=10$), SM+dB ($n=8$), dB-AMPC ($n=9$).

Se observó que todos los grupos obtuvieron una curva de aprendizaje normal, variando en su número de errores. Por ejemplo los grupos control y SM obtuvieron los niveles más altos de errores respecto a los experimentales SM+db-AMPc y db-AMPc. Sin embargo la tendencia en la disminución del número de errores en cada día fue uniforme para todos los grupos. Esta misma directriz se mantuvo para la fase de reversión donde los promedios fueron similares entre los grupos.

Posterior a la evaluación de errores primarios, se analizaron los errores totales, los cuales se cuantificaron como el número de veces que las ratas persistieron en asomar la cabeza por los diferentes agujeros del laberinto, a pesar de haber encontrado ya su agujero de escape.

Errores Totales

Con el propósito de conocer si existieron diferencias en este parámetro entre los diferentes grupos, se obtuvo el promedio de las cuatro sesiones (en ambas fases; aprendizaje y reversión) a las que fueron sometidos los grupos.

La Figura 29 muestra el curso temporal de los ensayos durante la ejecución de la tarea del laberinto de Barnes en ambas fases, aprendizaje y reversión, de los diferentes grupos evaluados; control, SM, SM+db-AMPc y db-AMPc. Esta medición no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

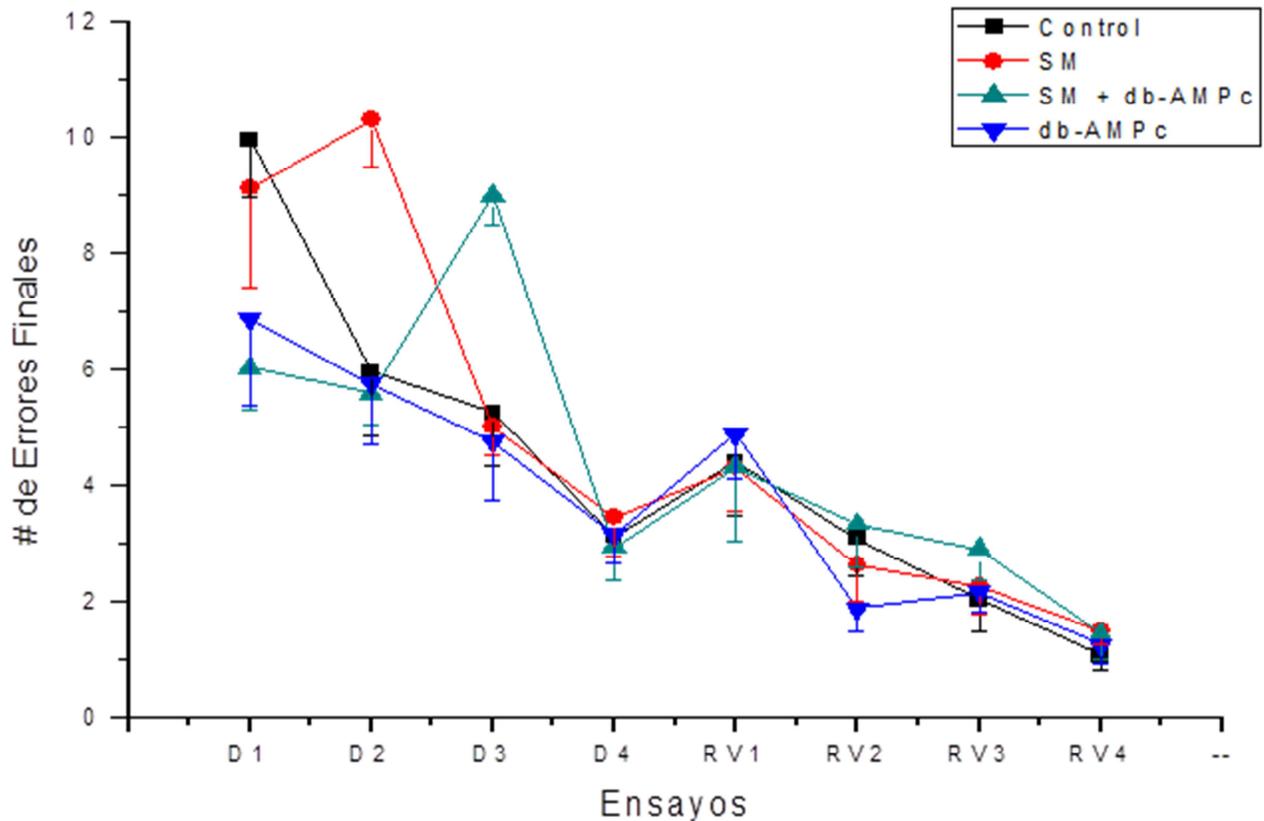


Figura 29. Errores Totales. Gráfica que muestra el número de errores totales con el Laberinto de Barnes a las 12 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con una ANOVA mixto. Control ($n=8$), SM ($n=10$), SM+dB ($n=8$), dB-AMPC ($n=9$), $*p < 0.05$.

Se mostró que en los errores totales tampoco existieron diferencias significativas entre todos los grupos evaluados. Además, el curso temporal de los ensayos de ambas fases es muy similar al mostrado anteriormente en los errores primarios.

En conjunto, y analizando que no hubo diferencias significativas entre los grupos en el apartado de número de errores (primarios y totales), fue necesario preguntarse si existían diferencias en el tiempo que las ratas de los diferentes grupos demoran en ejecutar la tarea dentro del laberinto de Barnes. Es por esto, que el siguiente parámetro que se evaluó dentro del paradigma fue la latencia, tanto primaria como final.

Latencia Primaria

Se cuantificó la latencia primaria con el objetivo de evaluar el tiempo que las ratas emplearon desde el inicio de la sesión hasta su encuentro por primera vez con el agujero de escape.

La Figura 30 muestra el curso temporal de los ensayos durante la ejecución del laberinto de Barnes incluyendo ambas fases, aprendizaje y reversión de los grupos evaluados en este parámetro: control, SM, SM+db-AMPc y db-AMPc.

En la fase de aprendizaje se observa que tanto el grupo control como el SM obtuvieron los mayores promedios en el tiempo de exploración, ambos por arriba de los 50 segundos (58.8 ± 2.9 s para el grupo control y 50 ± 2.4 s para el SM) comparado con los valores iniciales de los grupos experimentales; grupo SM+db-AMPc 39.6 ± 1.7 s y grupo db-AMP 39.8 ± 1.9 s. La tendencia de los grupos durante los días subsecuentes de esta fase fue la de disminuir gradualmente el tiempo de ejecución de la tarea, por lo que para todos los grupos se puede observar una curva de aprendizaje típica.

Respecto de la fase de reversión, si bien tampoco existieron diferencias notables entre los cuatro grupos analizados, sí hubo una paridad de resultados entre pares de grupos; por un lado los grupos control y SM mostraron una cinética similar en su curso temporal, manteniendo la tendencia de disminuir el tiempo de ejecución resultando en una curva típica de aprendizaje; por su parte, los grupos experimentales SM+db-AMPc y el db-AMPc, además de obtener promedios muy similares en el curso temporal de sus ensayos, éstos no mostraron una tendencia normal y/o esperada, ya que en los días RV3 y RV4 incrementaron su tiempo de ejecución de manera equivalente.

Estos resultados fueron analizados por medio de ANOVA mixto, y no se revelaron resultados significativos en ningún punto.

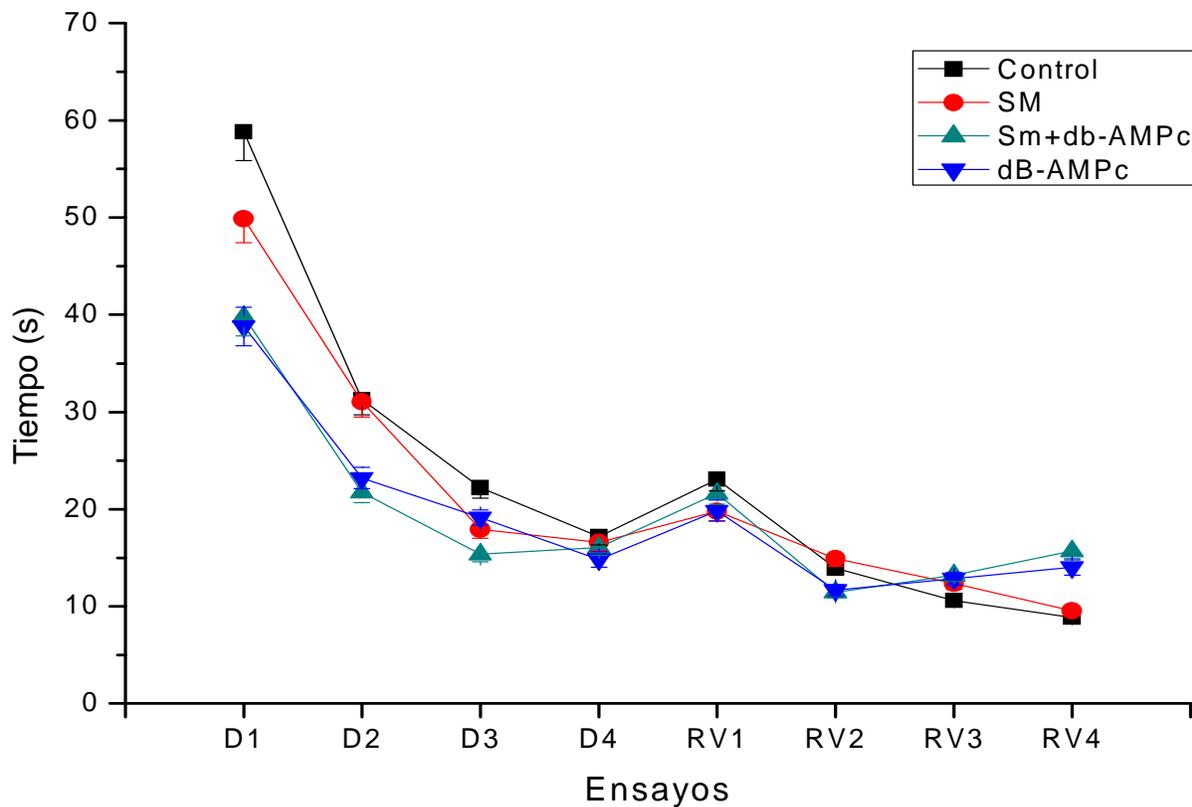


Figura 31. Latencia Primaria. Gráfica que muestra las curvas obtenidas en la medición de latencia primaria en el laberinto de Barnes a las 12 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con una ANOVA mixto. Control (n=8), SM (n=10), SM+dB (n=8), dB-AMPC (n= 9), * $p < 0.05$.

Se observa que a pesar de que no existen diferencias significativas entre los cuatro grupos, si persiste una tendencia por parte de los grupos control y SM a ocupar mayor tiempo en la ejecución de la tarea en ambas fases (aprendizaje y reversión). Asimismo, resalta el hecho que todos los grupos muestran una curva típica de aprendizaje en la primera fase, sin embargo, estos valores se invierten para los grupos SM-dB-AMPC y dB-AMPC.

Una vez analizados estos datos, fue necesario saber si existían diferencias de los grupos en la latencia total.

Latencia Total

Se cuantificó el tiempo desde el inicio del ensayo hasta el final del mismo (una vez transcurridos 4 minutos o si la rata permanecía 10 segundos dentro de la caja de escape sin asomarse), con el fin de medir el tiempo que emplearon las ratas en concluir la tarea del Laberinto de Barnes.

En la fase de aprendizaje el tiempo que emplearon los grupos control y SM obtuvieron los mayores promedios de los cuatro días de ensayos; control 49.03 ± 1.4 s y SM 45.39 ± 7.5 s. Por su parte el grupo SM-db-AMPc obtuvo un promedio de 36.35 ± 5.6 s y finalmente el promedio del grupo db-AMPc fue de 40.01 ± 9.3 s durante la fase de aprendizaje del laberinto de Barnes.

Respecto de la fase de reversión, los promedios de los cuatro grupos no se diferenciaron entre sí: control 26.61 ± 4 s; SM 27.28 ± 2.9 s; SM+db-AMPc 28.8 ± 2.5 s y db-AMPc 27.03 ± 2.8 s, respectivamente (ver Figura 31).

Estos resultados fueron analizados por medio de ANOVA mixto, y no revelaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$). En la siguiente gráfica se muestra el curso temporal de los ensayos en el laberinto de Barnes para cada grupo en ambas fases.

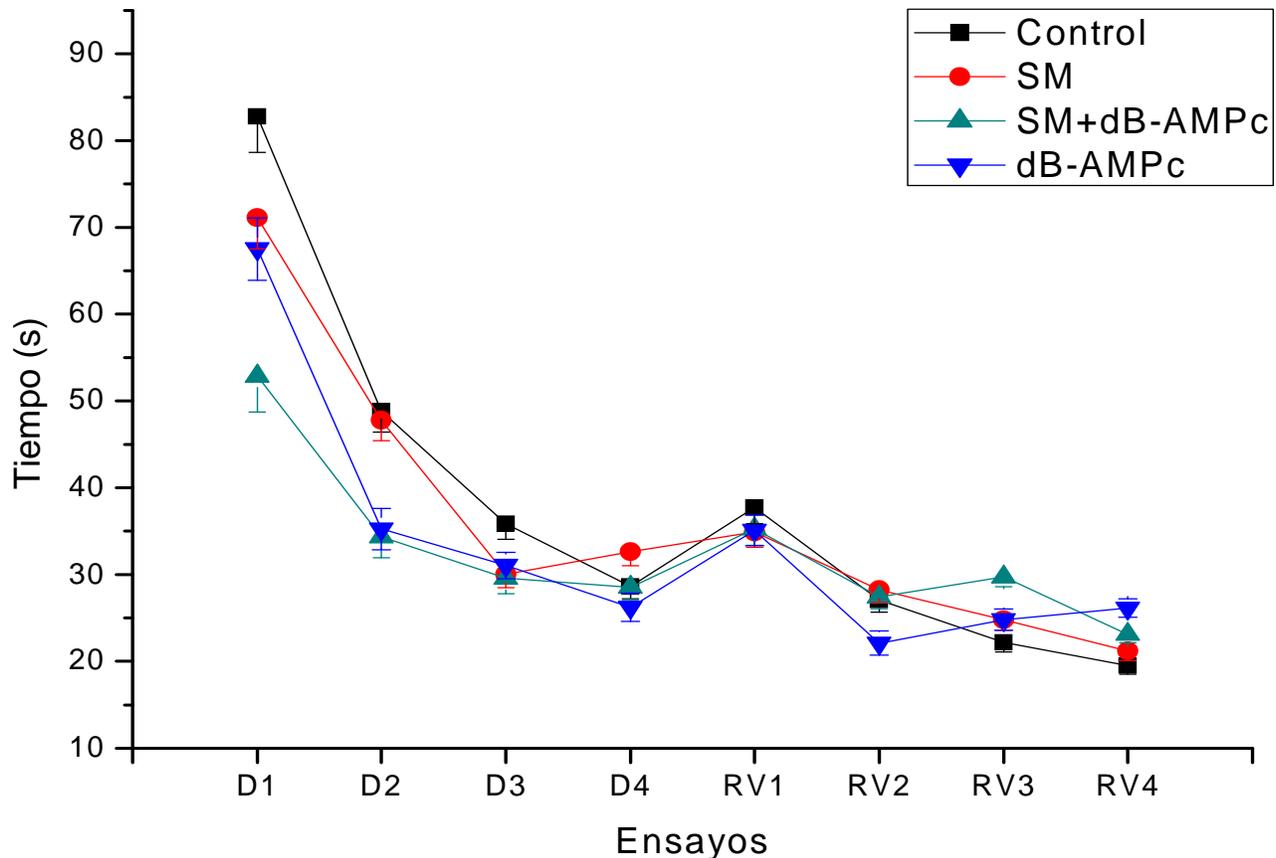


Figura 32. Latencia Total. Gráfica que muestra las curvas obtenidas de la medición de la latencia total en el laberinto de Barnes a las 12 semanas de tratamiento con agua al 20% de sacarosa. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con ANOVA mixto. Control (n=8), SM (n=10), SM+dB (n=8), dB-AMPC (n= 9), * $p < 0.05$.

Se observa que en la fase de adquisición el tiempo invertido por los grupos experimentales SM+db-AMPC y db-AMPC es ligeramente menor que los controles (control y SM). En esta fase todos los grupos, a excepción del grupo SM el cual obtuvo un incremento en la latencia en el día cuatro, obtuvieron una curva de aprendizaje, ya que el tiempo invertido disminuyó conforme pasaron los ensayos; sin embargo, en el periodo de reversión, esta tendencia no se mantuvo uniforme, ya que se observa que solo los grupos control y SM mantuvieron una disminución gradual en el tiempo de ejecución, el resto de los grupos se comportaron de una forma inconsistente y no mostraron dicha curva de aprendizaje, debido a que en los últimos días invirtieron mayor tiempo de ejecución dentro del paradigma. Este resultado se

debió a que las ratas a pesar de encontrar el agujero de escape no se metieron en éste o no permanecieron diez segundos dentro del mismo y continuaron su exploración.

Hasta aquí los resultados obtenidos y analizados de los cuatro parámetros anteriores (errores primarios y totales, y latencia primaria y total) no nos han mostrado diferencias significativas entre los cuatro grupos comparados (control y SM contra SM+db-AMPC y db-AMPC) $p < 0.05$. Esto muestra que a pesar de que existen tendencias en el comportamiento (número de errores y tiempo de ejecución del paradigma) entre los grupos, no alcanzan a ser claras para establecer que el proceso de aprendizaje es notablemente diferente.

Una de las ventajas del protocolo del laberinto de Barnes es que al mismo tiempo se pueden evaluar dos procesos, el aprendizaje y también la memoria. Por lo que se evaluó también la MLP. Como ya se mostró anteriormente, se cuantificó la MLP a 24 horas del último ensayo. Sin embargo se requirió conocer cómo era el comportamiento de los grupos, y especialmente de aquellos a los que se les aumentó el nivel de AMPc, en la ejecución de la MLP a 5 días del último ensayo y si sus resultados fueron diferentes respecto a los controles.

Memoria a Largo Plazo (MLP) 5 días después

La evaluación de la MLP es una medición que se utiliza para reconocer la eficacia en la retención de este proceso y en su mejoramiento dentro de un contexto visuoespacial.

Con objeto de probar si el efecto significativo observado a las 24 horas (ver Figura 18) era persistente, se decidió repetir la evaluación varios días después de la última aplicación de dB-AMPC.

Por lo tanto, se calculó el porcentaje de aciertos obtenidos en los distintos grupos a fin de comparar los resultados obtenidos entre sí 5 días después de la última aplicación del dB-AMPC y determinar así, si el incremento artificial de los niveles de

AMPc en el interior de la célula mejora el desempeño en la MLP en forma permanente.

Con el número de aciertos, como indicador de retención para medir MLP, se ha establecido que a menor número de aciertos, menor retención y que a mayor número de aciertos mayor retención.

En la Figura 32 se muestra el porcentaje de los 5 grupos analizados en este parámetro. Se muestra que el grupo control obtuvo un porcentaje promedio de $45.49\% \pm 6$; el grupo SM obtuvo un porcentaje de $47.3\% \pm 3$; por su parte el grupo SM+dB-AMPc obtuvo un porcentaje de $58.46\% \pm 6$; el porcentaje del grupo dB-AMPc fue de $57.53\% \pm 8$; finalmente, el grupo vehículo obtuvo un porcentaje de $54,87\% \pm 7$ de aciertos en la ejecución de esta medición; los datos fueron analizados por medio de ANOVA de dos vías y dado que los grupos tratados con dB-AMPc no revelaron diferencias significativas respecto del grupo en el que se administró únicamente el vehículo, estos datos se consideraron no significativos ($p > 0.05$). En la siguiente figura se muestra la cuantificación de este tipo de proceso.

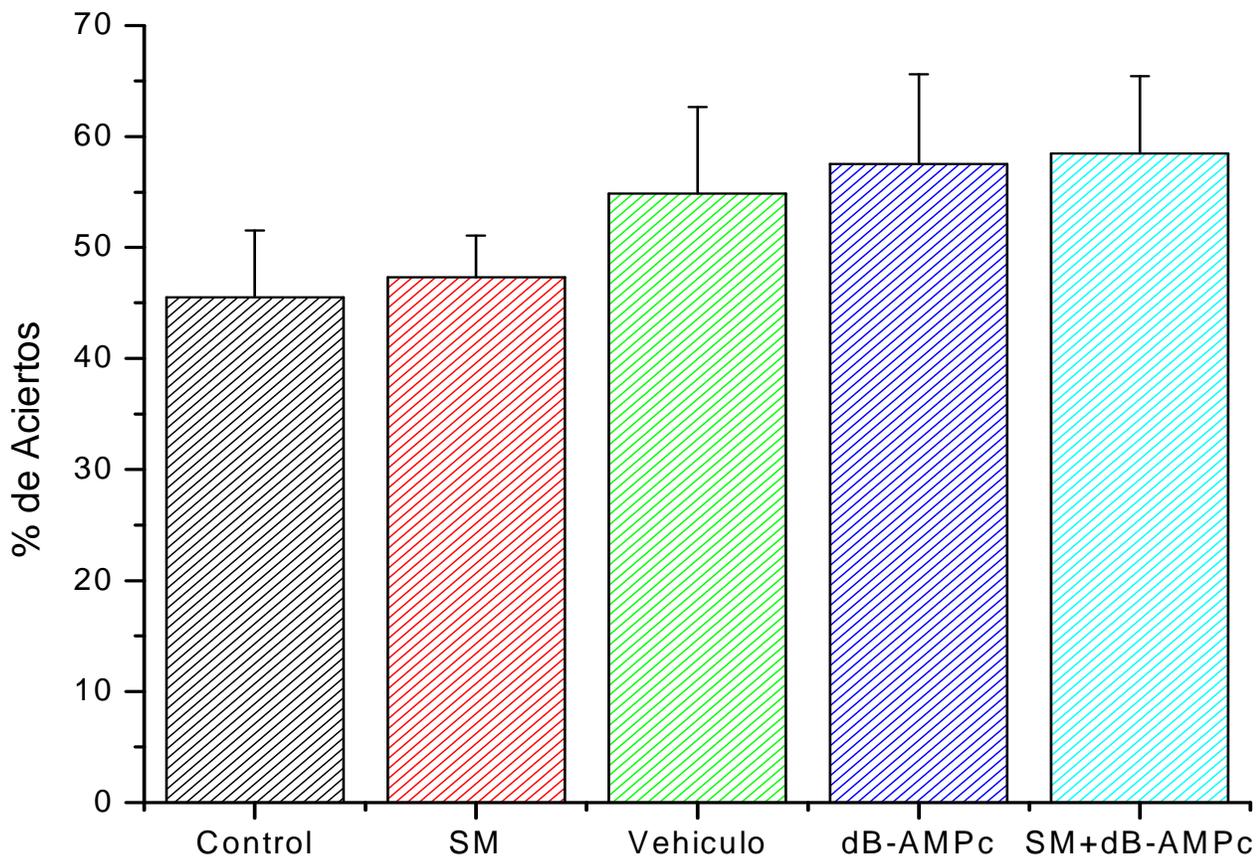


Figura 33. MLP a 5 días. Gráfica que muestra el porcentaje de aciertos en la evaluación de la memoria 5 días después del último ensayo en el laberinto de Barnes. Los datos representan el promedio \pm ES obtenido con ANOVA de dos vías, Control ($n=8$), SM ($n=10$), SM+dB ($n=8$), dB-AMPC ($n=9$), Vehículo ($n=6$), $*p < 0.05$.

Una vasta literatura ha mostrado que la activación de PKA mejora las funciones en la memoria a largo plazo en el hipocampo, específicamente cuando se administra algún activador en la fase de consolidación. Por lo anterior, es interesante comparar los datos del grupo SM+dB-AMPC y el grupo dB-AMPC.

De esta forma, los resultados a nivel cognitivo muestran que no existen cambios en el tiempo de ejecución, ni el número de errores que se cometen dentro laberinto de Barnes entre los diferentes grupos evaluados. Es decir, no hay una diferencia aparente en la fase correspondiente a la fase de aprendizaje evaluado con dicho laberinto a las 13 semanas de tratamiento con una dieta alta en carbohidratos

suministrada por sacarosa al 20% p/v. Sin embargo, es en el proceso de memoria donde se encontraron diferencias significativas y relevantes para este estudio en particular. Los grupos a los que se les administró el activador de AMPc, fueron los que obtuvieron los mayores porcentajes de aciertos en esta tarea (a 24 horas de la última aplicación). Cabe destacar que comparado con el grupo SM, el grupo SM+db-AMPc tuvo una mayor retención de la información para cumplir con éxito el objetivo de la tarea dispuesta, lo que sugiere una posible recuperación debido a la activación artificial de la vía de PKA, y a su vez sea considerada como una vía alterna, sujeta a pruebas futuras, para el tratamiento de la disfunción cognitiva en la memoria en el caso del SM.

IX. DISCUSIÓN

El SM es una alteración cuya incidencia se ha acrecentado en años recientes como consecuencia de diversos factores; el estilo de vida sedentaria, en combinación con dietas altas en nutrientes y/o carbohidratos (la cual la mayoría de los países industrializados hoy día consumen), acompañadas de una baja actividad física, resultan ser los principales factores que ha propiciado el incremento alarmante de esta patología (Kosari, 2011; Larqué et. al. et. al, 2011; Martínez, 2011). En específico, el consumo de una dieta alta en sacarosa compromete la regulación de ingesta y gasto energético por parte del organismo, además de cambios en diferentes zonas cerebrales involucradas con la ingesta de alimentos (Kanoski, 2011). Asimismo, dietas altas en carbohidratos genera complicaciones metabólicas en el organismo, que lo vuelve más propenso a un deterioro cognitivo y/o a desarrollar otras enfermedades derivadas como consecuencia del exceso en el consumo de éstos (Molteni, 2002; Yaffe, 2004 y 2009; Grundy, 2004; Boden-Albala, 2007; Yates, 2012; Frisardi, 2010).

En este estudio, se administró una dieta alta en sacarosa con el objetivo de ser un modelo animal controlado y equiparable a la dieta alta en carbohidratos a las que el ser humano y los países industrializados consumen de manera permanente.

Dentro de este modelo animal existen diferencias particulares que enaltecen la relevancia del impacto que ocasiona este tipo de dieta a nivel metabólico y cognitivo. En condiciones normales el cerebro detecta el estado energético periférico y responde con la regulación del equilibrio entre la ingesta de energía, el gasto necesario para cubrir todos los requerimientos del organismo y el almacenamiento que se hará como reserva energética. Todo lo anterior con el fin de mantener el peso dentro de un margen bien delimitado (Routh, 2010). Sin embargo, existen patologías en las cuales este mecanismo homeostático se encuentra alterado, por ejemplo, en el SM, ya que el consumo de dieta alta en sacarosa genera un fallo en la regulación de ingesta y gasto energético por parte del organismo, además de cambios en diferentes zonas cerebrales involucradas con la ingesta de alimentos y que a su vez

repercuten en un bajo desempeño cognitivo en diferentes tareas (Avena 2010; Kanoski, 2011).

En los resultados obtenidos en este estudio se observó que las ratas a las que se les sometió a la dieta alta en sacarosa tuvieron un mayor consumo total de agua que las ratas control, además de que disminuyeron de manera dramática su consumo de alimento. Estos datos coinciden con lo dicho por el grupo de Avena y cols. en el 2010 donde explica que las ratas regulan estrechamente, por medio de su mecanismo homeostático, la ingesta calórica y el gasto energético adecuado; sin embargo, al proporcionar una dieta por un periodo de tiempo mayor, este mecanismo finalmente se rompe, provocando un mayor consumo calórico. A pesar de este incremento en el consumo calórico, existen datos en la literatura que establecen que no hay relación directa con el incremento en el peso corporal u obesidad (Avena, 2008). Lo anterior, coincide con los resultados obtenidos puesto que no se observaron diferencias significativas en el peso entre el grupo con dieta alta en sacarosa y el grupo control. El peso corporal resultó insuficiente para determinar posibles diferencias entre ambos grupos, por lo que se realizó una medición más detallada de la composición corporal de los organismos.

Los resultados del grupo con dieta alta en sacarosa y a las 12 semanas de tratamiento mostraron mayor cantidad de grasa total y de agua total corporal respecto al grupo control, datos que coinciden por lo dicho por el grupo de Kosari en el 2012 donde observó un incremento del tejido graso visceral.

Larqué et. al. en el 2011 reportan que dentro de las mediciones metabólicas implicadas en el SM, los niveles de triglicéridos se encuentran alterados desde una edad temprana (6 semanas). En concordancia, los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por la literatura concerniente. Se aprecia que los niveles de triglicéridos en el grupo con dieta alta en carbohidratos son considerablemente elevados respecto a los obtenidos por el grupo control; este resultado revela que a este tiempo de tratamiento (11 semanas) las ratas sometidas a ingesta con sacarosa (20% p/v), son positivas a este criterio.

Otro de los parámetros subyacentes al SM es la hipertensión arterial, sin embargo, este dato ha sido poco documentado dentro de la literatura, además, solo la presión sistólica ha sido posible ser reportada hasta este trabajo (Kanazawa 2003; Larqué et. al. 2011). La presión diastólica determina el grado de resistencia periférica, es decir, el esfuerzo del corazón en cada latido respecto del lecho vascular y, en esta tesis, se reporta novedosamente esta medición.

Los resultados mostraron niveles significativamente mayores en la presión arterial, tanto sistólica como diastólica, en el grupo sometido a la dieta alta en sacarosa respecto del grupo control. Estos datos coinciden con la literatura concerniente en la que ya se ha visto que una dieta alta en sacarosa provoca un aumento en los niveles de presión arterial (Kanazawa, 2003).

El SM provoca una disminución en la capacidad para metabolizar la glucosa, provocando una intolerancia a ésta y reflejándose en un comportamiento cinético anormal de la curva de tolerancia a la glucosa (Larqué et. al., 2011), esto coincide con los resultados obtenidos, ya que el grupo con la dieta alta en sacarosa mostró alteraciones en su curva de tolerancia a la glucosa respecto del control.

Resumiendo hasta este punto, el grupo sometido a una dieta alta en sacarosa reunió los tres criterios mínimos para establecer la incidencia del SM (triglicéridos, presión arterial, curva de intolerancia a la glucosa) (Grundy, 2004), por lo que se puede concluir que este modelo resultó positivo para desarrollar SM a las 12 semanas de tratamiento.

- *Dieta alta en sacarosa y memoria visuoespacial*

La conducta de ingesta de alimentos, clásicamente está asociada principalmente con dos áreas específicas del cerebro: el área del hipotálamo lateral, que tiene como función principal la inducción de la conducta de ingesta, y el núcleo ventromedial, que se ve implicada en las señales de saciedad. Lo anterior se comprobó mediante estimulaciones y lesiones en dichas regiones. Por ejemplo, la estimulación tanto eléctrica o mediante aminoácidos excitatorios del hipotálamo lateral, induce la conducta alimenticia; por el contrario la lesión en hipotálamo lateral hace que los

animales dejen de comer o beber. Por otra parte, las lesiones del núcleo ventromedial del hipotálamo provocaban una alimentación excesiva que desembocaba en obesidad mórbida, mientras que la estimulación eléctrica suprimía la ingesta (Carlson, 2007); también se ha mostrado evidencia de la participación de otras áreas del hipotálamo, como son el área dorsomedial, la paraventricular y, recientemente, del núcleo arqueado (Carlson 2007).

El sistema límbico, es un conjunto de estructuras cerebrales interconectadas que controlan la motivación y la emoción. Este sistema está formado por los núcleos anteriores del tálamo, amígdala, hipocampo, corteza límbica y partes del hipotálamo, así como a sus haces de fibras de conexión (Carlson, 2007). Algunas de estas estructuras que conforman al sistema límbico son susceptibles de sufrir alteraciones debido al impacto que tienen cierto tipo de dietas, concretamente el hipocampo; por lo que un incremento en la ingesta de carbohidratos hace relación con la aparición de patologías que involucran la memoria, el aprendizaje y propicia la incidencia de Alzheimer (Frisardi, 2010, Kanoski 2011).

Resumiendo hasta aquí, el aumento en la ingesta de carbohidratos produce el incremento en el peso corporal debido a fallas en estructuras específicas que controlan la homeostasis, a su vez este desequilibrio provoca alteraciones en tareas dependientes de hipocampo en ratas sometidas a una dieta alta en carbohidratos, específicamente en tareas de memoria visuoespacial, como en el laberinto de Morris donde los animales presentan una mayor latencia para resolver la tarea, además de fallas en procesos de retención, es decir, la MCP y MLP (Kanoski, 2011 y 2012). En el presente estudio fueron evaluadas las tareas antes mencionadas por medio del laberinto de Barnes, a través de los indicadores en la medición de los errores, latencias, así como de la MLP a 24 horas y a 5 días.

En los resultados obtenidos de las mediciones realizadas, tanto en la cuantificación de errores promedio como en la latencia durante la ejecución del laberinto de Barnes si bien mostraron pequeñas diferencias, éstas no alcanzaron a ser significativas entre los grupos evaluados. Por ejemplo, en el periodo de aprendizaje tanto las ratas control como las ratas con dieta alta en sacarosa obtuvieron los mayores

puntajes promedio respecto de los demás grupos; sin embargo, en la medición del promedio de errores totales, es el grupo con dieta alta en sacarosa el cual se mantiene constante respecto de este parámetro obteniendo el mayor porcentaje de errores respecto del control y al grupo experimental SM+dB-AMPc. Este resultado puede ser debido a que la estrategia de exploración en el grupo de ratas control es diferente, ya que éstas asoman la cabeza mayor número de veces y de forma aleatoria a lo largo del laberinto comparado con el resto de los grupos experimentales (Gutiérrez-Guzmán, 2011). Estos resultados también concuerdan con el hecho de que se han encontrado déficits en otro tipo de paradigmas conductuales con dieta alta en carbohidratos en tareas de memoria visuoespacial y memoria de trabajo, como en el laberinto radial, laberinto en T y el laberinto de Morris (Petri-Guerra, 2010; Dinel, 2011; Kanoski, 2011, 2012; Pintana, 2012). Esta tendencia se mantuvo en la fase de reversión.

Lo anterior se puede explicar debido a que la dieta alta en carbohidratos repercute en el funcionamiento del hipocampo, generando fallas en tareas de aprendizaje y memoria del laberinto de Barnes a las 12 semanas de tratamiento con sacarosa; lo cual podría explicar que estos cambios sean discretos. Estos resultados coinciden con la literatura reportada (Petri-Guerra, 2010; Kanoski, 2011 y 2012). Otra explicación posible radica en el neurotransmisor glutamato el cual se ha relacionado con fenómenos de aprendizaje y memoria mediante su acción post-sináptica sobre los receptores NMDA, fuertemente relacionados con la memoria (Carlson 2007, Morris, 2002, Abel, 2008). Se ha sugerido que la ingesta alta en calorías produce deficiencia en los transportadores glutamatérgicos, lo cual desemboca en un incremento de este neurotransmisor en el espacio sináptico; este fenómeno a su vez, genera menor número de receptores NMDA post-sinápticos (Abel, 2008; Petri-Guerra, 2011; Valladolid-Aceves, 2011), concluyendo que toda esta alteración a nivel molecular repercute en un desempeño anómalo en el laberinto de Barnes, como se observó en este estudio.

Otro de los parámetros evaluados fue el tiempo de ejecución del laberinto, es decir, las latencias (primaria y total). En este rubro tampoco existieron diferencias

significativas entre el grupo control y el grupo al que se le dio una dieta alta en sacarosa, no obstante se observa que el grupo con la dieta especial obtuvo un tiempo ligeramente menor del control. En contraposición, el análisis de la curva típica de aprendizaje resulta diferente en el grupo con dieta alta en sacarosa puesto que en el día 4 de esta fase se observa un pico en el tiempo, aspecto que no se observa en el grupo control el cual muestra una curva de aprendizaje típica. Lo anterior se puede discutir partiendo de diversos grupos de trabajo en el cual se observa que en roedores con una dieta alta en sacarosa se obtiene una mayor latencia en el ejecución de tareas visuoespaciales en los laberinto de Morris, radial y T (Petri-Guerra, 2010; Dinel 2011; Kanoski 2011 y 2012).

Las diferencias con los grupos a los cuales se les administró dB-AMPC son más notorias sin llegar a ser significativas y se discutirán posteriormente.

- PKA y la plasticidad neural

La idea de que los cambios en la eficacia de las sinapsis en diversos circuitos neuronales podrían mediar el almacenamiento de la información adquirida durante el aprendizaje ha sido objeto de estudio durante mucho tiempo. Estas hipótesis teóricas sobre el crecimiento de las conexiones neuronales en el cerebro y las circunstancias en que tal crecimiento podría tomar lugar se remontan a Ramón y Cajal y, en la segunda mitad del siglo XX, a Hebb y Konorski. La primera evidencia experimental surgió de los estudios de la habituación y la sensibilización en la *Aplysia* de Kandel (Takeuchi, 2013). Actualmente, se sabe que las vías neuronales son plásticas y continuamente cambiantes en respuesta a estímulos internos y externos. Estos intercambios pueden ocurrir en sitios sinápticos, así como en lugares no-sinápticos a lo largo de la neurona (Jayachandran, 2014). La plasticidad neural se define como cambios en vías neuronales y sinapsis que se deben a cambios en el comportamiento, el medio ambiente y los procesos neuronales, así como los cambios que resultan de lesiones corporales. La plasticidad neural puede servir a una multitud de funciones; en primer lugar, la plasticidad podría ser un

homeostático natural en la regulación de las tasas de disparo o excitabilidad dentro de una red neural; en segundo lugar, podría ser mnemónico puesto que contribuye a la base de la memoria o engrama; en tercer lugar, podría servir como un mecanismo de metaplasticidad, una plasticidad de orden superior que afecta la plasticidad intrínseca. Tales cambios metaplásticos podrían servir para regular futuros procesos de plasticidad dependientes de experiencias y por lo tanto afectar la plasticidad de comportamiento (Sehgal, 2013).

Como se mencionó anteriormente las vías neuronales cambian tanto en sitios sinápticos como en lugares no-sinápticos. Ambas, la plasticidad sináptica y la plasticidad intrínseca pueden ser inducidos por los mismos estímulos (por ejemplo, aprendizaje o la estimulación *in vitro*). Además, ambas están mediadas por las mismas vías de señalización intracelular. Por ejemplo, los dos tipos de plasticidad dependen de la activación de NMDA y de algunas cascadas intracelulares tales como PKA, PKC, y CaMKII (Daoudal y Debanne, 2003). En particular, una importante vía de señalización que subyace la regulación de la plasticidad neural es el AMP cíclico / vía de PKA. Esta cascada de señalización neuronal está implicada tanto en la plasticidad sináptica como en el aprendizaje. Tiene lugar en los receptores acoplados a proteína G, lo que resulta en la activación de la adenilato ciclasa que produce AMPc a través de la estimulación de la subunidad de $G\alpha_s$. AMPc a su vez activa la PKA, que impulsa cambios a largo plazo en la eficacia sináptica a través de efectos directos sobre la pre y/o post-sinapsis, y por medio de la regulación dependiente de CREB (Insel, 2003). Jayachandran (2014) recientemente propone un rol importante de la regulación de la vía de PKA para la plasticidad sináptica, lo que abre debate para explorar más sobre esta vía y su vínculo con procesos que conllevan plasticidad neural, como el LTP, aprendizaje y memoria.

En el estudio de modelos de mamíferos de trastornos cognitivos humanos o los estados de enfermedad que implican la interrupción en el aprendizaje y la memoria, la plasticidad sináptica es una parte importante de la caracterización del modelo. Además, la plasticidad sináptica se asocia frecuentemente con las pruebas de

comportamiento de aprendizaje y la memoria, y se utiliza a menudo como una medición cuantificable de la eficacia de un agente terapéutico en el modelo específico (Banko, 2011). Una gran evidencia demuestra que la LTP y la memoria son inducidos por mecanismos similares. Por ejemplo, el bloqueo de receptores NMDAR bloquea eficazmente LTP y limita el aprendizaje de los roedores en las tareas de memoria dependiente del hipocampo (Morris, 2000). Por el contrario, la estimulación del hipocampo en la medida en que hace que la mayoría de las conexiones sinápticas en área CA1 sea plásticas, puede inhibir el aprendizaje espacial y la memoria (Morris, 2000), lo que sugiere una íntima relación entre los procesos de la función sináptica del hipocampo y los subyacentes al aprendizaje y la memoria.

Los cambios en la excitabilidad neuronal son específicos de aprendizaje. Un ejemplo de lo anterior son los animales que aprenden en una prueba de condicionamiento. Estos experimentos permiten sugerir que la plasticidad intrínseca podría contribuir a la formación de memoria. Sin embargo un rol mnemónico para la plasticidad intrínseca como mecanismo para el mantenimiento de una memoria a largo plazo parece poco probable debido a que estos cambios son transitorios (que duran sólo unos pocos días), mientras que la expresión conductual de la memoria puede durar semanas, meses o incluso años (Jayachandran, 2014). En el hipocampo, el aumento de la excitabilidad intrínseca de las neuronas CA1 ya no es evidente 7 días después de la adquisición o condicionamiento, a pesar de que la expresión del comportamiento de la memoria es evidente por lo menos durante 6 meses. Cabe destacar que en algunos casos relacionados con plasticidad sináptica dependiente de aprendizaje puede ser persistente y, por tanto, puede ser la base de ciertas memorias a largo plazo (Sehgal, 2013). Sin embargo, la mayoría de los estudios que han analizado la evolución temporal de la plasticidad intrínseca inducida por el aprendizaje han encontrado que estos cambios son de corta duración. Lo anterior coincide con los resultados encontrados en esta tesis en los cuales se observan cambios (mayor porcentaje de aciertos) en la evaluación de la MLP a 24 horas de haber activado la vía de PKA como estrategia para mejorar la memoria visuoespacial (ver Figura 18). Los grupos SM+dB-AMPC y dB-AMPC obtuvieron los mayores

porcentajes de aciertos en la tarea, comprobando así, la implicación de PKA en el mejoramiento de esta tarea. Sin embargo, los cambios conductuales en la misma tarea pero a 5 días de la activación de PKA no fueron significativos en dichos grupos, lo que también coincide con lo reportado por Sehgal (2013). Una posible explicación que subyace lo encontrado en este trabajo se puede sugerir a partir de lo propuesto por Moyer y cols. en 1996 (Revisado en Sehgal, 2013), quienes sugieren que en el hipocampo, el curso temporal de una mayor excitabilidad intrínseca refleja un período de tiempo en el cual las memorias están experimentando el proceso de consolidación. Con el tiempo, mientras el trazo de la memoria se transfiere a estructuras superiores, la plasticidad intrínseca transitoria podría facilitar la consolidación de la memoria del hipocampo a estructuras corticales, como la corteza prefrontal (Wierzynski, Lubenov, Gu, y Siapas, 2009). Este proceso de consolidación a nivel de sistema requiere la reactivación y reproducción de memorias y el aumento de la excitabilidad podría facilitar estos procesos mediante la reducción del umbral de disparos de espigas neuronales. Por lo tanto, la mejora transitoria de la excitabilidad puede facilitar procesos que permite la formación exitosa de memoria sin codificar directamente la memoria (Sehgal, 2013).

La plasticidad neural dependiente de aprendizaje dentro de una estructura específica puede facilitar la adquisición de nuevos aprendizajes. Por ejemplo, durante el período de aumento de la excitabilidad neuronal, la adquisición de la tarea del laberinto de agua de Morris dependiente de hipocampo se facilita (Zelcer et al., 2006). Sin embargo, es importante señalar que la mejora relacionada con el aprendizaje no se ha observado en todos los estudios reportados. Por ejemplo, el entrenamiento simultánea contrario a un entrenamiento consecutivo, en dos tareas dependientes del hipocampo (condicionamiento del parpadeo y laberinto de Morris), facilita la adquisición del condicionamiento del parpadeo pero no de la tarea del laberinto de Morris (Kuo, Lee, y Disterhoft, 2006, revisado en Sehgal, 2013). Los resultados obtenidos en el trabajo aquí expuesto pueden ser otro ejemplo de lo dicho por Kuo y cols (revisado en Sehgal 2013), ya que no se encontraron diferencias significativas en la evaluación de la MLP a 5 días de haber inducido un proceso de plasticidad neural por medio de la activación de la vía de PKA (ver Figura 32). Estos

datos indican que la facilitación inducida por el aprendizaje puede depender de otros factores, incluyendo la naturaleza y objetivos de los paradigmas utilizados.

El establecimiento de las contingencias que permitan la facilitación inducida por el aprendizaje, así como de más trabajos que incluyan diferentes estrategias para facilitar la plasticidad neural desde diversos enfoques es, sin duda, una nueva y muy inexplorada rama de estudio para investigadores de la memoria. Lo anterior podría tener impacto a diversos niveles en el plano conductual ya que todo el procesamiento de información en el cerebro implica sinapsis, por lo que implícitamente todas las anormalidades en la función cerebral afectan, directa o indirectamente, la función sináptica (Südhof, 2008). La disfunción cognitiva y conductual se ha relacionado con un desequilibrio en la plasticidad sináptica y de las sinapsis excitatorias e inhibitorias (Jayachandran, 2014). Los trastornos cognitivos y conductuales son resultado de alguna disfunción neuronal, sin embargo, las causas moleculares subyacentes a éstos siguen sin conocerse. Entre las posibles causas de estas disfunciones se encuentran las variantes en el número de copias genéticas y diferentes alteraciones en los genes que predisponen a enfermedades neuroconductuales y cognitivas. Hasta el momento, los genes candidatos que se asocian con el deterioro cognitivo se han ubicado en las sinapsis, lo que sugiere que la disfunción sináptica está involucrada en los trastornos neuroconductuales. Sin embargo, aún no se conoce el vínculo directo existente entre estos genes propuestos y los trastornos cognitivos (Jayachandran, 2014). La comprensión de los mecanismos fundamentales que subyacen a la formación de memoria y la plasticidad neural puede influir en una mayor capacidad para maximizar los efectos beneficiosos de la plasticidad dependiente de experiencia/aprendizaje, y así facilitar el desarrollo de estrategias de tratamiento dirigidas a mejorar nuestra calidad de vida.

- Relación de la vía de PKA con la memoria visuoespacial

El aprendizaje y la memoria son procesos centrales de este estudio. El conocimiento adquirido es inicialmente almacenado en memoria a corto plazo. Posteriormente, si este conocimiento es reforzado mediante la repetición, es consolidado en memoria a

largo plazo (Bermúdez-Rattoni, 2008). Este almacenamiento de la información en el cerebro comúnmente se origina por una alteración persistente en la eficiencia de la transmisión de la sinapsis. Estos procesos tanto de aprendizaje como de memoria son cruciales para la supervivencia de los organismos, por lo que ha existido un gran interés en la ciencia por comprender los mecanismos subyacentes a los mismos (Perumal, 2007).

Un creciente número de vías de señalización intracelular han sido identificadas por su participación en la traslación de señales a la sintaxis de la representación neural de la memoria (Micheau, 1999). Entre las proteínas que han sido identificadas en la memoria visuoespacial específicamente incluyen al NMDA, los receptores a serotonina, CaMKII, proteínas CREB, PKC, el óxido nítrico y PKA. Estas señales intracelulares empiezan probablemente con el cierre de los canales de potasio y el incremento en la entrada de calcio que, entre otras funciones, desencadena reacciones de fosforilación/desfosforilación. Así, los altos niveles intracelulares de calcio promueven la fosforilación, mientras que niveles bajos estimulan la actividad de las fosfatasas (Micheau, 1999, Abel 2008).

La fosforilación es una modificación química covalente que utilizan las células para el control de las propiedades de una gran variedad de proteínas como las enzimas, receptores, canales y demás. Ejemplo de lo anterior son las proteínas cinasas que son fosfotransferasas que catalizan un grupo fosfato del ATP en grupos alcohol de los residuos serina y/o treonina o un grupo fenol de tirosina en cadenas de péptidos. (Micheau, 1999, Katche, 2013).

En procesos complejos como lo son el aprendizaje y la memoria se requiere de una efectividad en la actividad enzimática que dure por lo menos minutos o incluso horas, y esto requiere mucho más que el flujo de calcio existente a través de la membrana.

Katche y colaboradores en el 2013 realiza una revisión acerca de la implicación de las proteínas cinasas en la consolidación de la memoria. Menciona que la actividad hipocampal de PKA es requerida en por lo menos dos intervalos: uno después del

entrenamiento y el otro varias horas después (Bernabéu, 1996 y 1997). Además, activación persistente de PKA con una duración de 20 horas también fue observada después de una facilitación sináptica en la *Aplysia* (Sutton, 2001).

Los resultados de errores y latencia arrojados por este trabajo no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, y como ya se mencionó anteriormente, muestran tendencias. Los dos grupos a los cuales se les administró el activador de PKA, tanto el denominado SM+ dB-AMPC como el nombrado dB-AMPC obtuvieron los menores puntajes (promedio) tanto en errores como en latencia. Esto habla de un mejoramiento discreto de la tarea de aprendizaje por aumento de la vía AMPC.

Asimismo se evaluó la MLP en dos momentos; el primero a 24 horas de haber concluido la fase de aprendizaje, y el segundo 5 días después. De una manera significativa, ambos grupos, SM+ dB-AMPC y dB-AMPC obtuvieron el mayor porcentaje de aciertos respecto del grupo control y al que solo tenía el SM instalado, a las 24 horas de la última aplicación de dB. Estos datos fehacientes concluyen un mejoramiento de la MLP a 24 horas en las ratas con una afección metabólica inducida, en este caso el SM, cuyo impacto negativo en tareas cognitivas como el aprendizaje y la memoria ha sido mostrado aquí (Frisardi, 2010; Petri-Guerra, 2011; Dinel, 2011; Kanoski, 2011 y 2012). Este mejoramiento de la MLP se centra dentro de un paradigma de memoria visuoespacial como lo es el laberinto de Barnes y concuerda con los datos mostrados por Sharifzadeh (Sharifzadeh, 2007 y 2010) donde se observa que los animales tratados con dB-AMPC presentan mejoras en el tiempo de ejecución del laberinto de Morris (paradigma de memoria visuoespacial equivalente al laberinto de Barnes), es decir en la latencia.

Extensa literatura reporta que la acción de mejorar la vía de PKA tiene consecuencias positivas en los procesos de aprendizaje, pero sobre todo en la memoria (Arstein, 2005; Abel, 2008; Ma, 2009; Sharifzadeh, 2007, 2010; Petri-Guerra, 2011). Es por eso que en este trabajo se buscó mejorar la actividad de ésta vía estrechamente relacionada con la memoria, ante un paradigma de disfunción cognitiva causada por el SM.

Sorprendentemente, los datos obtenidos presumen que el grupo que fue tratado con dB-AMPc sin ninguna otra afección, obtuvo valores por debajo de los obtenidos por los grupos SM y control en las mediciones de errores y latencias, sugiriendo así la acción específica que tuvo el dB-AMPc mejorando parcialmente el proceso de aprendizaje. Aún más revelador resulta el dato que arroja los resultados del grupo SM+dB-AMPc, el cual resultó ser el que menor cantidad de errores cometió en la prueba, además de ser también el que menor tiempo de ejecución se llevó para resolver el laberinto. Estos resultados, al ser comparados respecto del grupo control y especialmente contra el grupo SM, trascienden en mostrar una clara mejoría de una función cognitiva comprometida por una patología implicada en el deterioro de la misma.

A pesar de que los resultados en la fase de aprendizaje no son estadísticamente significativos, sí manifiestan cambios indicadores de que ratas tratadas 12 semanas con una dieta alta en carbohidratos y a las cuales se les realizó una maniobra experimental, mejorándoles la actividad de la vía de PKA, tienen un mejor desempeño que las ratas sometidas únicamente a la dieta especial sin la activación de la vía de PKA.

Otro objetivo del presente estudio fue el evaluar si la mejoría presentada en los grupos tratados con dB persistía varios días después de la última aplicación. Si bien existieron diferencias significativas en las ratas a las cuales se les sobreactivó la vía de PKA (grupo SM+dB-AMPc y grupo dB-AMPc) y obtuvieron los mejores porcentajes en la MLP a las 24 horas de la última administración del dB-AMPc, no fue así a los 5 días, ya que las diferencias encontradas, no fueron significativas.

Los datos obtenidos en la evaluación de la MLP son concluyentes al mostrar que debido al dB-AMPc existe una mejora parcial en la fase de aprendizaje dentro de un paradigma de memoria visuoespacial ante una afección metabólica como lo es el SM. Asimismo, y de una manera más categórica, el dB-AMPc, mejoró la MLP a 24 horas de los animales con el SM a las 13 semanas de tratamiento. Este dato correspondió a lo revisado en la literatura, donde se ha mostrado que una mejora en la actividad de la vía de PKA conduce a cambios positivos en la ejecución de

paradigmas que evalúan la memoria (Arstein, 2005; Abel, 2008; Ma, 2009; Sharifzadeh, 2007, 2010; Petri-Guerra, 2011).

Una de las problemáticas actuales más grandes a nivel internacional y sobre todo nivel nacional, es el alto porcentaje de obesidad y sobrepeso de la población, que compromete al organismo no solo física y metabólicamente sino también cognitivamente. El SM representa una patología seria debido a que es predecesora a otros padecimientos y porque a su vez, compromete de manera importante la cognición de quien lo padece. Por otro lado, una extensa literatura muestra la implicación e importancia que tiene la vía de PKA dentro de procesos cognitivos fundamentales como son la memoria y el aprendizaje, por lo que se ha establecido que una activación en esta vía conduce a la facilitación del LTP y así mejora el desempeño en tareas de memoria.

Existe por lo tanto evidencia del daño que produce el SM tanto a nivel metabólico como cognitivo, sin embargo, este estudio toma gran relevancia debido a que se propone por primera vez una solución que permita revertir el daño ocasionado por el SM e incrementar la eficacia en tareas cognitivas comprometidas por esta patología. De esta forma se plantea al dB-AMPC y a la vía de PKA como puntos claves para proponer el diseño de tratamientos futuros que reviertan el daño cognitivo de la memoria ocasionado por el SM. Sin embargo, más estudios son requeridos para comprobar los datos aquí sugeridos y que relacionan el impacto de la vía de PKA en condiciones de SM, ya que existe la posibilidad de que sean independientes y existan otros mecanismos para mejorar la memoria que se relacionan con el deterioro en el SM. La Figura 33 ilustra un modelo explicativo al respecto.

Esta tesis expone la necesidad de que posteriores estudios con activadores de la vía de PKA, y con el dB-AMPC mismo, son necesarios para extender los datos aquí obtenidos y los encontrados en la literatura actual, estableciendo así una novedosa línea de investigación en el campo de la restitución funcional y/o rehabilitación, dentro de un paradigma de SM.

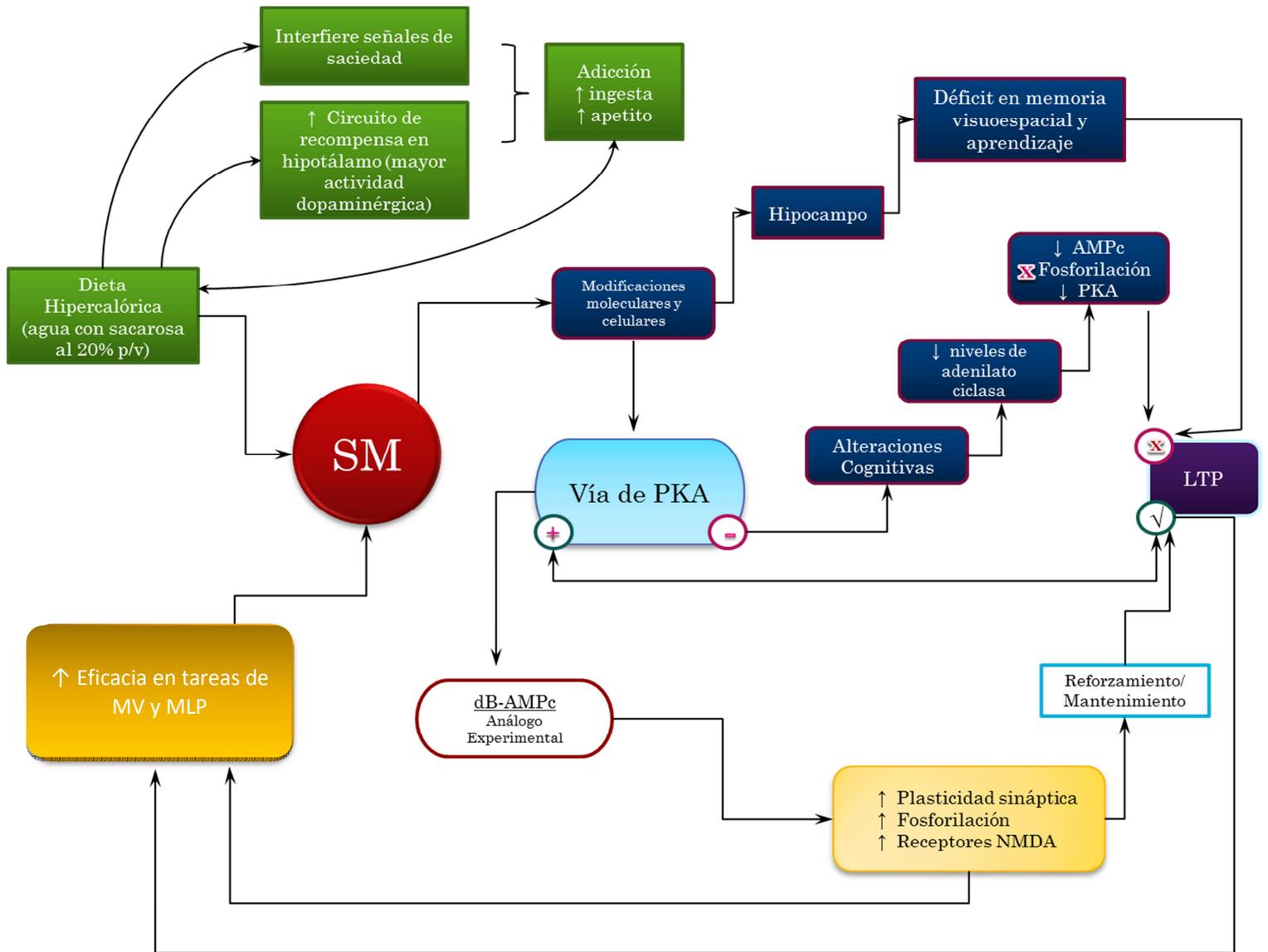


Figura 34. Modelo Explicativo. La ingesta de una dieta hipercalórica produce la aparición del SM, además, activa el circuito de recompensa en el hipotálamo mediante el incremento de la actividad dopaminérgica, lo que aumenta el apetito e interfiere con las señales de saciedad, generando un mantenimiento y *a posteriori* un mayor consumo de la dieta hipercalórica (adicción). Por otro lado, el SM provoca modificaciones moleculares y celulares en el hipocampo lo que lleva a un déficit en tareas de memoria y aprendizaje. Estas modificaciones se deben a una disminución en la actividad de PKA, debido a bajos niveles de la adenilato ciclasa que trae como consecuencia una disminución del AMPc y de la cascada de fosforilación originada por la activación de PKA, lo que ocasiona una interferencia en el LTP y en MV. Por otra parte, la activación de la vía de PKA mediante dB-AMPC

aumenta la plasticidad sináptica, además de desencadenar la cascada de fosforilación de PKA y el número de receptores NMDA; asimismo, provoca un reforzamiento/mantenimiento del LTP revirtiendo el daño generado por el SM en la MV y aumentando la eficacia en tareas de MLP.

X. CONCLUSIONES

- ◆ El modelo de dieta hipercalórica con agua al 20% de sacarosa (p/v) utilizado en este estudio predispone al desarrollo de SM en los sujetos experimentales a las 12 semanas de tratamiento.
- ◆ El SM produce alteraciones en tareas de aprendizaje y MV evaluadas con el laberinto de Barnes a las 13 semanas de tratamiento. Estas diferencias no fueron significativas.
- ◆ Los grupos a los cuales se les administró dB-AMPC obtuvieron los menores porcentajes de errores así como el menor tiempo de resolución dentro del laberinto de Barnes a las 13 semanas de tratamiento. Estas diferencias no fueron significativas.
- ◆ Los grupos tratados con dieta hipercalórica durante 13 semanas y a los que se les administró dB-AMPC mejoraron en la MLP 24 horas después de la última aplicación, evaluada con el laberinto de Barnes. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas.
- ◆ Estos grupos evaluados nuevamente 5 días después de la última administración de dB-AMPC, no revelaron diferencias estadísticamente significativas.
- ◆ Los resultados obtenidos en esta tesis con la activación de la vía de PKA, mediante la aplicación de dB-AMPC, permiten proponer el diseño de tratamientos futuros que reviertan el daño cognitivo de la memoria ocasionado por el SM.

XI. REFERENCIAS

- Abel, T., Nguyen P.V., Barad, M., Deuel. T., Kandel, E. y Bourtchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 88, 615–626.
- Abel, T. y Nguyen P.V. (2008). Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP dependent protein kinase. *Prog Brain Res* 169: 97-115.
- Abrams TW. (2009). Cyclic AMP (cAMP) Role in Learning and Memory. In: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press; pp. 265–277.
- Akbaraly, T.N., Kivimaki M., Shipley M.J., Tabak A.G., Jokela M. (2010). Metabolic Syndrome over 10 years cognitive functioning in late midlife. *Diabetes Care*, 33(1), 84 - 89. doi: 10.2337/dc09-1218.
- Almaguer, W. Bergado-Rosado, J. y Cruz-Aguado, R. (2005). Plasticidad sináptica duradera (LTP): un punto de partida para entender los procesos de aprendizaje y memoria. *Revista Cubana de Informática Médica* 1 (5). 1684-1685.
- Amaral D. y Witter M. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31 (3), 571–591.
- ANSA, Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad, (2010). Recuperado de <http://www.promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/programas/Auerdo%20Original%20con%20creditos%2015%20feb%2010.pdf>
- Arstein, A., Ramos B.P., Birnbaum S.G. y Taylor JR. (2005). Protein kinase A as a therapeutic target for memory disorders: rationale and challenges. *TRENDS in Molecular Medicine* .11 (3).
- Assis Souza, M., Magni D.V., Guerra G.P., Oliveira M.S., Furian A.F., Pereira L., Marquez S.V., Ferreira J., Figuera M.R. y Royes L.F. (2012). Involvement

of hippocampal CAMKII/CREB signaling in the spatial memory retention induced by creatine. *Amino Acids* 43: 2491–2503.

- Avena, N., Bocarsly, M., Rada, P., Kim, A., Hoebel, B. (2008). After daily bingeing on a sucrose solution, food privation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior* 94: 309-315.
- Avena, N. (2010). The study of food addiction using animal models of binge eating. *Appetite* (55): 734-737.
- Baddeley, A. (2003). Working Memory: Looking Back and Looking Forward. *Neuroscience*, 4, 829 - 839. doi:10.1038/nrn1201
- Baddeley, A. (2012). Working Memory: Theories, Models, and Controversies. *Annu. Rev. Psychol.* 63: 1-29.
- Balazi, A. (2012). Activators of protein kinase A and oxytocin affect rabbit reproduction. *Cent. Eur. J. Biol.* • 7(6): 973-979.
- Banko JL, Trotter J., Weeber EJ. (2011). Insights into synaptic function from mouse models of human cognitive disorders. *Future Neurol.* 6(1): 113–125.
- Barnes, C. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93: 74–104.
- Barnes, C. (1998). Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *TINS* 14: 163-169.
- Bernabéu, R., Bevilaqua L., Ardenghi P., Bromberg E., Schmitz P., Bianchin M., Izquierdo I. y Medina J.H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7041–7046.
- Bernabéu, R., Schmitz P., Faillace M.P., Izquierdo I., Medina J.H. (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *NeuroReport*, 7, 585–58

- Bermúdez-Rattoni y Prado, R. (2008). Memoria: dónde reside y cómo se forma. 2ª Ed. (pp. 11 - 26). México: Trillas.
- Bliss T.V.P y Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol* 232, 331-356
- Bliss T.V.P y Collingridge G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31 – 39.
- Bourin, M., Petit-Demouliere B. y Chenu F. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177: 245-255.
- Carlson, N.R. (2007). Fisiología de la conducta, 8ª Ed. Madrid: Pearson.
- Chrenek, P., Grossmann R., Sirotkin A.V. (2010). The cAMP analogue, dbcAMP affects release of steroid hormones by cultured rabbit ovarian cells and their response to FSH, IGF-I and ghrelin. *European Journal of Pharmacology* 640: 202–205.
- Chrenek, P., Makarevich A.V., Balazi A., Fazekasová J., Schlarmannová J., Matejovicová B. y Sirotkin A.V. (2013). The Effect of the cAMP Analogue, dbcAMP, on Proliferation and Apoptosis of Rabbit Oviductal Cells. *Folia Biologica* 61: 3-4.
- Dash P.K., Moore A.N., Kobori N. y Runyan J.D. (2011). Molecular activity underlying working memory. *Learn. Mem.* 14: 554-563.
- Daoudal, G., & Debanne, D. (2003). Long-term plasticity of intrinsic excitability: Learning rules and mechanisms. *Learning and Memory* 10: 456–465.
- Deisseroth K y Bito H. (1996). Signaling from synapse to nucleus: Postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuro* 16: 89-101.
- Diné, A.L., André, C., Aubert, A., Ferreira, G., Layé, S. y Castanon, N. (2011). Cognitive and Emotional Alterations Are Related to Hippocampal Inflammation in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. *PLoS One* 6(9): e24325.

- Eftekharzadeh, B., Ramin M., Khodagholi F., Moradi S., Tabrizian K., Sharif R., Azami K., Beyer C. y Sharifzadeh M. (2012). Inhibition of PKA attenuates memory deficits induced by amyloid (1-42) and decreases oxidative stress and NF- κ B transcription factors. *Behavioural brain research* 226: 301- 308.
- Etchepareborda, M.C., y Abad-Mas, L. (2005). Memoria de trabajo en los procesos básicos del aprendizaje. *Revista de Neurología*, 40 (1), 79-83.
- Frisardi V., Scafato E., Capurso C., D'Introno A., Colacicco A.M., Vendemiale G., Baldereschi M., Crepaldi G., Di Carlo A., Galluzzo L., Gandin C., Inzitari D., Maggi S., Capurso A. y Panza F. (2010). Metabolic syndrome and the risk of vascular dementia: the Italian Longitudinal Study on Ageing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 81(4):433-40.
- Gutiérrez-Guzmán, B.E., Hernández-Pérez J.J., González-Burgos I., Feria-Velásco A., Medina R., Guevara M.Á., López-Vázquez M.Á. y Olvera-Cortés M.E. (2011). Hippocampal serotonin depletion facilitates place learning concurrent with an increase in ca1 high frequency theta activity expression in the rat. *European journal of pharmacology* 652: 73–81.
- Gelinás J.N., Banko, J.L., Peters, M., Klann, E., Weeber, E.J., y Nguyen, P.V. (2008). Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long lasting synaptic potentiation in the hippocampus. *Learning & Memory* 15: 403–411.
- González, A., et al. (2002). Consenso Mexicano sobre el Tratamiento Integral del Síndrome Metabólico. *Rev Mex Cardiol* 13 (1): 4-30.
- Grundy, S., Brewer H.B. Jr, Cleeman J.I., Smith S.C. Jr, Lenfant C.; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association. (2004). Definition of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on

Scientific Issues Related to Definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(2):13-8.

- Harrison, F.E., Reiserer R.S., Tomarken A.J. y McDonald M.P. (2006) Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning and memory* 13(6): 809-819.
- Havekes, R., Timmer Mm, y Van der Zee E.A. (2007). Regional Differences in Hippocampal PKA Immunoreactivity after Training and Reversal Training in a Spatial Y-Maze Task. *Hippocampus* 17: 338-34.
- Hebb, D. (1949). The organization of behavior, NewYork: Wilcy.
- Heiskanen, T., Niskanen L.K., Hintikka J.J., Koivumaa-Honkanen H.T., Honkalampi K.M., Haatainen K.M. y Viinamäki H.T. (2006). Metabolic Syndrome and Depresión: a Cross-Sectional Analysis. *J Clin Psychiatry* 67: 1422-1427.
- Hernández, P.J. y Abel, T. (2008).The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. *Neurobiology of Learning and Memory* 89: 293–311.
- Insel PA, Ostrom RS (2003) Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol* 23: 305–314.
- Katche, C., Cammarota M. y Medina J.H. (2013). Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiology of Learning and Memory* 106. 40–47.
- Kanazawa, M., Xue, C., Kageyama, H., Suzuki, E., Ito, R. y Namba, Y. (2003). Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. *Nutrition reviews*, 106: 473-481.
- Kandel, E., Hawkins, R.D., Lalevic, N. y Clark, G.A. (1989). Classical conditioning of the Aplysia siphon-withdrawal reflex exhibits response specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(19): 7620–7624.
- Kandel E., Schwartz J. (1997). Neurociencia y Conducta. Madrid: Prentice Hall.

- Kandel, E, Schwartz J., Jessell T. (2000) Principles of Neural Science. New York: McGraw-Hill.
- Kandel, E. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Molecular Brain*, 5:14.
- Kanoski, S.E. y Davidson, T.L. (2010). Different Patterns of Memory Impairments Accompany Short and Longer-Term Maintenance on a High-Energy Diet. *Journal of Experimental Psychology* 36 (2). 313–319.
- Kanoski, S.E. y Davidson, T.L. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & Behavior*, 103, 59- 68.
- Kanoski, S.E. (2012). Cognitive and neuronal systems underlying obesity. *Physiology & Behavior* 106. 337–344
- Kosari, S., Badoer, E., Nguyen, J., Killcross, S. y Jenkins, T. (2012). Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. *Behavioural Brain Research*, 235, 98 – 103
- Khorshidahmad T, Tabrizian K, Vakilzadeh G, Nikbin P, Moradi S, Hosseini-Sharifabad A, Roghani A, Naghdi N, Sharifzadeh M. (2012). Interactive effects of a protein kinase A inhibitor and testosterone on spatial learning in the Morris water maze. *Behav Brain Res*.17; 228(2):432-9.
- Kozumplik, O. y Uzun, S. (2011). Metabolic Syndrome in patients with depressive disorders- features of comorbidity. *Psychiatria Danubina* 23 (1): 84-88.
- Larqué et. al., C., Velasco M., Navarro-Tableros V., Duhne M., Aguirre J., Gutiérrez-Reyes G., Moreno J., Robles-Díaz G., Hong E. y Hiriart M. (2011). Early Endocrine and Molecular Changes in Metabolic Syndrome Models. *Life* 63(10): 831–839.
- Ma, N., Abel, T. y Hernandez, J. (2009). Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A. *Learning & Memory* 16:367–370.

- Martínez. A. (2011). Síndrome metabólico, su reversibilidad y características en un modelo animal. Programa de Maestría y Doctorado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Milner, B, Squire, LR, y Kandel E. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445-468.
- Miskiw, J.C., Fiorenza N.G., Izquierdo L.A. y Izquierdo I. (2010). Molecular mechanisms in hippocampus and basolateral amygdala but not in parietal or cingulate cortex are involved in extinction of one-trial avoidance learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 94: 285–291.
- Molteni, R., Barnard, R., Ying, Z., Roberts, K., Gonzáles-Pinilla, F. (2002). A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*, 112 (4), 803-814.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, 40(5), 289-297.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11: 47-60.
- Morris, R., Riedel G., Micheau J., Lam A.G., Roloff E.L., Martin S.J., Bridge H., de Hoz L., Poeschel B. y McCulloch J. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature Neuroscience* 2, 898 – 905.
- Morris, R., Martin S.J. y Grimwood P.D. (2000). Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience* 23: 649-711
- Nassireslami, E., Nikbin P., Payandemehr B., Amini E., Mohammadi M., Vakilzadeh G., Ghadiri T., Noorbakhsh Fy Sharifzadeh M. (2013). A cAMP analog reverses contextual and tone memory deficits induced by

- a PKA inhibitor in Pavlovian fear conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 105. 177–182.
- Neumann, S., Bradke F., Tessier-Lavigne M. y Basbaum A.I. (2002). Regeneration of Sensory Axons within the Injured Spinal Cord Induced by Intraganglionic cAMP Elevation. *Neuron*, Vol. 34, 885–893.
 - Nguyen, P.V., Duffy S.N., Craddock K.J y Abel T. (2001). Environmental Enrichment Modifies the PKA-Dependence of Hippocampal LTP and Improves Hippocampus-Dependent Memory. *Learning & Memory* 8:26–34.
 - Nguyen, P.V. y Woo, N.H. (2003). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Progress in Neurobiology*. 71(6), 401–437.
 - Olton, D.S., y Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 2: 97-116.
 - O'Leary, T, Brown, R. (2012). The effects of apparatus design and test procedure on learning and memory performance of C57BL/6J mice on the Barnes maze. *Journal of Neuroscience Methods* 203: 315-323.
 - Organización Mundial de la Salud (OMS). (2012) recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
 - Ostroveanu, A. (2009). Novel cyclic AMP signalling avenues in learning and memory. University of Groningen.
 - Petri-Guerra, G., Mello C.F., Bochi G.V., Pazini A.M., Fachinetto R., Dutra R.C., Calixto J.B., Ferreira J. y Rubin M.A. (2011). Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 96: 324–332.
 - Paxinos, G. (1997). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Compact 3ra. Ed. Academic Press, San Diego.
 - Pintana, H., Apaijai N., Pratchayasakul W., Chattipakorn N., Chattipakorn S.C. (2012). Effects of metformin on learning and memory

behaviors and brain mitochondrial functions in high fat diet induced insulin resistant rats. *Life Sciences*, 91, 409 - 414.

- Qiu, J., Cai D., Dai H., McAtee M., Hoffman P.N., Bregman B.S., Filbin M.T. (2002). Spinal Axon Regeneration Induced by Elevation of Cyclic AMP. *Neuron*, Vol. 34, 895–903.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Martins, M. R., Barichello, T., Medina, J. H., Roesler, R. et al. (2004). Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural Brain Research* 154: 339–343.
- Routh, V.H. (2010). Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors*. 10, 9002 - 9025.
- Rundfeldt, C., Steckel H., Sörensen T. y Wlaź P. (2012). The stable cyclic adenosine monophosphate analogue, dibutyryl cyclo-adenosine monophosphate (bucladesine), is active in a model of acute skin inflammation. *Arch Dermatol Res* 304: 313–317.
- Salazar, A.J.A. (2011). Diseño y construcción de un sistema de impedanciometría para la determinación de grasa corporal en ratas de laboratorio. Tesis de Maestría. Departamento de Ingeniería Eléctrica, CINVESTAV. México, D.F.
- Sari, S., Hannila S., Filbin MT. (2008). The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Experimental Neurology* 209: 321–332.
- Schuster, CHM, Davis G, et al. (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron* 17: 655-667.
- Segura, B., Jurado M.A., Freixenet N., Albuin C., Muniesa J., Junqué C. (2009). Mental slowness and executive dysfunctions in patients with metabolic syndrome. *Neuroscience Letters* 462: 49-53.
- Sehgal, M., Song, C., Ehlers, v., Moyer Jr, J. (2013). Learning to learn- Intrinsic plasticity as a metaplasticity mechanism for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 105: 186–199.

- Sharifzadeh, M., Zamanian A.R., Gholizadeh S., Tabrizian K., Etminani M., Khalaj S., Zarrindast M.R., Roghani A. (2007). Post-training intrahippocampal infusion of nicotine-bucladesine combination causes a synergistic enhancement effect on spatial memory retention in rats. *European Journal of Pharmacology* 562: 212-220.
- Sharifzadeh, M., Azami K., Etminani M., Tabrizian K., Salar F., Belaran M., Hosseini A., Hosseini-Sharifabad A. (2010). The quantitative evaluation of cholinergic markers in spatial memory improvement induced by nicotine-bucladesine combination in rats. *European Journal of Pharmacology* 636: 102-107.
- Sharifzadeh, M., Hosseini-Sharifabad A., Ghahremani M.H., Sabzevari O., Naghdi N., Abdollahi M., Beyer C., Bollen E., Prickaerts J., Roghani A. (2012). Effects of protein kinase A and G inhibitors on hippocampal cholinergic markers expressions in rolipram- and sildenafil-induced spatial memory improvement. *Pharmacol Biochem Behav* 101(3): 311-9.
- Slack, JR. y Pockett S. (1991). Cyclic AMP induces long-term increase in synaptic efficacy in CA1 region of rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 130: 69-72.
- Spatz, HC. (1995). Posttranslational modification of protein kinase A. The link between short-term and long-term memory. *Behavioral Brain Research* 66: 79-84.
- Spritzer, MD., Daviau E.D., Coneeny M.K., Engelman S.M., Prince W.T., Rodriguez-Wisdom K.N. (2011). Effects of testosterone on spatial learning and memory in adult male rats. *Hormones and Behavior* 59: 484–496.
- Sudhof TC (2008) Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455: 903–911.
- Sunyer, B.P., Hoyer, H.S., Lubec, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protocol Exchange*. 349: 1-14

- Squire, L.R. (1987). *Memory and brain*. New York, US: Oxford University Press.
- Squire, L.R. (2000). *Memory: From Mind to Molecules*. W.H. Freeman and Company, New York, 13-16.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 171–177.
- Takeuchi T, Duzskiewicz AJ, Morris RG. (2013). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369:20130288.
- Troncoso J., Lamprea, M., Cuestas, D.M, Múnera, A. (2010). El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. *Acta Biol. Colomb.* 15: 207-222.
- Tulving, E. (2002). Episodic Memory: from mind to brain. *Annual Review Psychology* 53: 1-25.
- Valladolid-Acebes, I., Stucchi, P., Cano, V., Fernández-Alfonso, M.S., Merino, B., Gil-Ortega, M., Fole, A., Morales, L., Ruíz Gayo, M., Del Olmo, N. (2011). High - fat diets impair spatial learning in the radial - arm maze in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95, 80 - 85
- Vázquez, S. (2000). Different Hippocampal Activity Profiles for PKA and PKC in Spatial Discrimination Learning. *Behavioral Neuroscience* 114 (6): 1109-1118.
- Wierzynski, C. M., Lubenov, E. V., Gu, M., & Siapas, A. G. (2009). State-dependent spike-timing relationships between hippocampal and prefrontal circuits during sleep. *Neuron* 61: 587–596.
- Xavier, G.F., Costa V.C. (2009). Dentate Gyrus and Spatial Behavior. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33: 762-773.
- Yaffe, K, Blackwell, M.S., Kanaya, M.D., Davidowitz, B.A., Barrett-Connor, E. y Krueger, K. (2004). Diabetes impaired fasting glucose, and

development of cognitive impairment in older women. *Neurology* 63(4): 658-63.

- Yaffe, K.F., Weston A.L., Blackwell T., Krueger K.A. (2009). The Metabolic Syndrome and Development of Cognitive Impairment Among Older Women. *Arch Neurol* 66(3):324-328.
- Yates, K.F., Sweat V., Yau P.L., Turchiano M.M., Convit A. (2012). Impact of Metabolic Syndrome on Cognition and Brain: A Selected Review of the Literature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(9): 2060–2067.
- Yin, J.C., Tully T. (1996). CREB and the formation of long-term memory. *Current opinion in Neurobiology* 6 (2): 264-268.
- Zelcer, I., Cohen, H., Richter-Levin, G., Lebiosn, T., Grossberger, T., & Barkai, E. (2006). A cellular correlate of learning-induced metaplasticity in the hippocampus. *Cerebral Cortex* 16: 460–468.