



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**Efecto de la inducción de potenciación
a largo plazo sobre la memoria
espacial por
estimulación optogénica de las
proyecciones catecolaminérgicas del
Locus Coeruleus al hipocampo.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS**

**PRESENTA:
ARENKI SUGEI VÁZQUEZ LECHUGA**

Facultad de Medicina



**TUTOR-DIRECTOR DE TESIS:
DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
Ciudad Universitaria, CD. MX.
2022**



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.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM: DGAPA-PAPIIT-UNAM grant IN212919 y IN213123.

Agradezco el apoyo brindado para la realización del trabajo experimental del MC. Dónovan K. Gálvez Márquez. Asimismo, al tutor del trabajo, el Dr. Federico Bermúdez Rattoni por el apoyo y guía durante el proyecto.

Agradezco al personal del bioterio del Instituto de Fisiología Celular por las facilidades brindadas. Agradezco a los profesores de la licenciatura en Neurociencias por brindarme herramientas invaluable para mi formación y desarrollo académico.

Agradezco especialmente a mi familia. A mis padres, A. Beatriz Lechuga Castanedo y Adrián Vázquez Brito por ser mi pilar y mi ejemplo a seguir. Agradezco a mi hermano, Ángel J. Vázquez Lechuga por su ayuda y disposición. A Daney Mendoza Mota por siempre motivarme e impulsarme. Agradezco a mis abuelos: José Vázquez Rosas y Ma. Concepción Brito Albo por el constante apoyo y guía, a mi abuela Ma. Carmen Castanedo Escobedo y mi tía Marlene Lechuga Castanedo por su disposición, atención y ánimo. Sin duda, el contar con su apoyo me permitió completar el presente trabajo y es mi fundamento para futuros proyectos.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	5
Resumen	7
INTRODUCCIÓN	
1. Aprendizaje y Memoria	8
2. Hipocampo	9
2.1 Evaluación de memoria espacial dependiente de hipocampo	11
3. Plasticidad sináptica y memoria	13
3.1 Mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica	15
4. Catecolaminas	16
4.1 Regulación catecolaminérgica en el hipocampo	17
4.2 Dopamina	17
4.3 Norepinefrina	19
5. Locus Coeruleus.....	19
6. Optogenética.....	21
6.1 Optogenética en el LC	22
7. Relevancia del estudio de la vía LC-CA1	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO	25
Hipótesis	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares	26
METODOLOGÍA	
1. Animales	27
1.1 Genotipificación	27
2. Cirugía estereotáxica	27
3. Tareas conductuales	28
3.1 Laberinto acuático de Morris	28
3.2 Laberinto de Barnes	28
4. Optogenética.....	29
4.1 Electrofisiología	29
4.2 Inducción de oLTP y conducta	30

5. Análisis estadístico	31
RESULTADOS	
1. Protocolo de inducción de oLTP	32
2. Caracterización de las tareas de memoria espacial	32
3. La expresión de oLTP por estimulación de la vía LC-CA1 aumenta la persistencia de la memoria	37
3.1 La inducción de oLTP aumenta la persistencia de la memoria en el laberinto acuático de Morris.....	38
3.2 La inducción de oLTP aumenta la persistencia de la memoria en el laberinto de Barnes .	39
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	45

Abreviaturas

AAV	Virus adenoasociado
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropanóico
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
AP	Anteroposterior
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BM	Laberinto de Barnes
CaMKII	Calcio- calmodulina cinasa II
ChR	Canal de rhodopsina
Cre	Cre recombinasa
CREB	Proteína de unión responsiva a AMPc
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DV	Dorsal-ventral
EPSCs	Corrientes postsinápticas excitatorias
eYFP	Proteína amarilla fluorescente
fEPSP	Potenciales postsinápticos excitatorios de campo
HFS	Estimulación de alta frecuencia
LC	Locus Coeruleus
LTD	Depresión de largo plazo
LTP	Potenciación de largo plazo
ML	Medial-lateral
MLP	Memoria de largo plazo
MWM	Laberinto acuático de Morris
NE	Norepinefrina
NET	Transportador de norepinefrina
nm	Nanómetros
NMDA	N-metil-D-aspartato

NpHR	Halo rodopsina
OLM	Memoria de localización de objeto
oLTP	Potenciación de largo plazo optogenética
ORF	Marco abierto de lectura
PKA	Proteína cinasa A
rAAV	Virus adenoasociado recombinante
sem	Error estándar de la media
SWR	Sharp wave ripples
TH	Tirosina hidroxilasa
VTA	Área tegmental ventral

Resumen

El aprendizaje es el proceso mediante el cual se adquiere nueva información a través de la experiencia y la memoria es la codificación y almacenamiento de esta información para su posterior recuperación. La formación de una nueva memoria involucra cambios en la eficiencia de las sinapsis, conocidos como plasticidad sináptica. Uno de los modelos más aceptados de plasticidad sináptica es la potenciación de largo plazo (LTP), la cual se ha propuesto como uno de los mecanismos que subyace al aprendizaje y la memoria. Por otro lado, sabemos que el hipocampo es una estructura que contiene células especializadas para la codificación y consolidación de la memoria espacial. Las catecolaminas tienen un papel esencial en el hipocampo durante procesos de aprendizaje de tareas de memoria espacial. El hipocampo dorsal recibe proyecciones catecolaminérgicas del Locus Coeruleus (LC). Se ha visto que la estimulación optogenética del LC puede inducir una LTP débil en el giro dentado. Sin embargo, hasta ahora no se ha dilucidado si existe una relación directa entre la inducción de LTP a través de la activación de las terminales catecolaminérgicas provenientes del LC hacia CA1 (LC-CA1) y el desempeño conductual de ratones en una tarea de memoria. Por lo tanto, en este trabajo se propone que la LTP inducida por medio de técnicas optogenéticas en la vía de LC-CA1 será capaz de aumentar la persistencia de la memoria dependiente de hipocampo. Para comprobarlo, estimulamos optogenéticamente las terminales catecolaminérgicas de la vía LC-CA1 utilizando ratones transgénicos TH-Cre a los cuales se les infundió un virus Cre-inducible para lograr la expresión de una proteína activada con luz, canal de rodopsina (ChR). Encontramos que esta estimulación indujo una LTP. Asimismo, utilizando ratones silvestres de la cepa C57BL/6J, observamos que tienen un mal desempeño en tareas de memoria dependiente de hipocampo cuando la evaluación se realiza 10 días después de haber concluido el entrenamiento. Estos resultados indican que el trazo de memoria, en ese momento, no es recuperado fácilmente. Sin embargo, los ratones que reciben la fotoestimulación de la vía LC-CA1 después de cada día de entrenamiento mejoran significativamente su desempeño. En conclusión, este proyecto da una evidencia directa de que se puede lograr la inducción de LTP en el hipocampo a través de la estimulación optogenética de la vía LC-CA1. Asimismo, se demuestra que esta LTP hipocampal mejora el trazo de memoria evaluado por el laberinto acuático de Morris (MWM) y el laberinto de Barnes (BM).

I. INTRODUCCIÓN

1. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje es el proceso mediante el cual se adquiere nueva información a través de la experiencia (Magee y Grienberger, 2020). La memoria es la codificación y almacenamiento de esta información para su posterior recuperación o evocación (Bear et al., 2020). Ambos procesos están íntimamente ligados y permiten a los organismos adaptarse al medio, adquirir nueva información y actualizar la información preexistente.

La memoria se divide en declarativa y no declarativa. La memoria declarativa, o explícita, se subdivide a su vez en memoria semántica, sobre conceptos, y memoria episódica, para experiencias autobiográficas (Eichenbaum, 2017). Este tipo de memoria se compone de los recuerdos a los que podemos acceder de manera consciente. Por otro lado, la memoria no declarativa, o implícita, está formada por la memoria procedimental, de habilidades y hábitos, y la memoria emocional. Este tipo de memoria no requiere un esfuerzo consciente para recordarse y es resultado de la experiencia directa y la práctica (Bear et al., 2020).

La memoria procedimental puede adquirirse a través de aprendizaje asociativo y no asociativo. La habituación y la sensibilización son formas de aprendizaje no asociativo. La habituación ocurre cuando se ignora un estímulo que se ha presentado repetidamente y se vuelve familiar. Por el contrario, la sensibilización se da cuando se intensifica la respuesta sensorial a todo estímulo que llegue después de uno muy fuerte (Kandel, 2001). El aprendizaje asociativo se logra a través de un condicionamiento. En un condicionamiento clásico ocurre la asociación entre un estímulo que normalmente evoca una respuesta fisiológica que podemos medir (estímulo incondicionado) y un estímulo que normalmente no evoca esta respuesta (estímulo condicionado) (Disterhoft y de Jonge, 1987). Asimismo, en el condicionamiento instrumental, una conducta predice una consecuencia. Es decir, se asocia un estímulo significativo para el individuo, como una recompensa o un castigo, con cierta acción (Bear et al., 2020).

La memoria se puede clasificar de acuerdo con su temporalidad en memorias de largo plazo, que duran días, meses o hasta años, y memorias de corto plazo, que se almacenan por algunos minutos u horas (Eichenbaum, 2017). La formación de una memoria se divide en adquisición, consolidación, evocación y reconsolidación. Durante la adquisición, los individuos son expuestos a cierto tipo de estímulos sensoriales que son codificados, procesados e integrados en el sistema nervioso (Domjan, 2007). Parte de la información adquirida pasa de un almacenamiento de corto plazo a la memoria de largo plazo, a este proceso se le llama consolidación (Tronson y Taylor 2007). En la consolidación, el trazo de memoria se establece en redes neuronales que pueden formar un engrama. Dicho engrama comprende los cambios fisiológicos y estructurales que se generan en las células a raíz de la experiencia (Bear et al., 2020). Durante la evocación, la memoria es reactivada y utilizada para guiar la conducta de los individuos (Kandel, 2001). Finalmente, la reconsolidación es el proceso mediante el cual las memorias previamente almacenadas pueden ser actualizadas o modificadas al ser reactivadas (Misanin et al., 1968; Donjan, 2007). Durante la reactivación el trazo de memoria se vuelve lábil para posteriormente poder reestabilizarse en la reconsolidación, integrando nueva información. En este trabajo estudiamos un modelo de memoria declarativa de tipo espacial de largo plazo.

Durante mucho tiempo se ha tratado de encontrar la localización de una memoria específica a través de la identificación de los engramas o trazos de memoria. A principios del siglo XX, el psicólogo Karl Lashley propuso que los engramas de una memoria se encontraban distribuidos ampliamente en toda la corteza cerebral (Nadel y Maurer, 2020). Posteriormente, en 1949, Donald Hebb acuñó el término de ensamble para referirse a todas las neuronas corticales que se activaban por un estímulo determinado (Domjan, 2007). Si la actividad en el ensamble persiste por un tiempo suficiente, ocurre la consolidación.

A raíz de estas observaciones, se han descrito diferentes modelos sobre la consolidación de la memoria. Por un lado, está el modelo estándar que establece que la información llega desde las áreas de asociación de la neocorteza hasta el lóbulo temporal medial, donde es procesada (Bear et al., 2020). En este punto se generan cambios entre las conexiones neuronales para crear un trazo de memoria a través del proceso de consolidación sináptica. Posteriormente ocurre la consolidación de sistemas, donde los engramas se mueven gradualmente hacia áreas de la neocorteza que se encuentran ampliamente distribuidas (Eichenbaum, 2017). En este modelo se considera que antes de la consolidación de sistemas la recuperación de una memoria depende del hipocampo. Sin embargo, una vez que la consolidación de sistemas se lleva a cabo el hipocampo ya no es tan esencial para acceder a la memoria ya que los engramas se encuentran en otras regiones. Además, este modelo menciona que la consolidación sináptica se completa rápidamente mientras que la de sistemas implica un proceso más lento (Squire et al., 2015). Tras la problemática que surge de la idea de un proceso que podría mucho tiempo para completarse y que no sería adaptativamente útil, Nadel y sus colegas propusieron el modelo de trazos múltiples el cual sostiene que el hipocampo siempre está involucrado en el almacenamiento de la memoria (Moscovitch y Nadel, 1998). De esta forma se da una explicación a los déficits en memoria que se presentan en ciertos tipos de amnesia retrógrada y que pueden durar más de 20 años. La hipótesis general de este modelo es que cada recuperación de una memoria episódica ocurre en un contexto diferente al de la experiencia inicial, lo cual reactiva el trazo de memoria involucrando al hipocampo. Posteriormente la información recordada se combina con nueva información sensorial entrante para generar un nuevo trazo de memoria que involucra tanto al hipocampo como a la neocorteza. Conforme pasa el tiempo, los trazos de memoria que se formaron en el hipocampo se van dispersando a otras áreas del sistema por lo que se requiere de lesiones más extensas para afectar a las memorias más remotas.

2. Hipocampo

A partir de 1957, tras el caso del paciente HM al cual se le removieron quirúrgicamente una gran porción de ambos lóbulos temporales (incluyendo ambos hipocampos) como tratamiento de epilepsia, se sabe que las estructuras del lóbulo temporal medial son particularmente importantes para la consolidación y el almacenamiento de la memoria declarativa (Squire y Wixted, 2011). Gracias a este acontecimiento, actualmente sabemos que hay memorias dependientes de estas estructuras. Incluso, se ha descrito que la estimulación eléctrica del lóbulo temporal medial puede producir sensaciones complejas en las que las personas reportan eventos parecidos a alucinaciones o recolecciones de experiencias pasadas (Bear et al., 2020).

Las principales vías de entrada al lóbulo temporal medial (donde se encuentra el hipocampo) vienen de áreas de asociación de la corteza cerebral que contienen información sensorial. Específicamente,

el hipocampo se conecta con 3 regiones corticales que rodean al surco rhinal: la corteza entorrinal, la corteza perirhinal y la corteza parahipocampal (Bear et al., 2020). Anatómicamente, el hipocampo está formado por 2 láminas plegadas, una de ellas forma al giro dentado y la otra al cuerno de Amón que se subdivide en 3 regiones: CA1, CA2 y CA3 (Knierim, 2015). La mayor vía de entrada al hipocampo proviene de la corteza entorrinal, a través del patrón perforante y llega a las células granulares del giro dentado. Estas neuronas envían proyecciones hacia los núcleos de las células piramidales de CA3 formando las fibras musgosas. A partir de esta región surgen axones que se ramifican, una parte de ellos sale del hipocampo a través del fórnix y la otra parte forma las colaterales de Schaffer que se conectan con CA1 (Knierim, 2015). A todo este circuito se le conoce como el circuito trisináptico (Fig. 1) (Squire y Wixted, 2011).

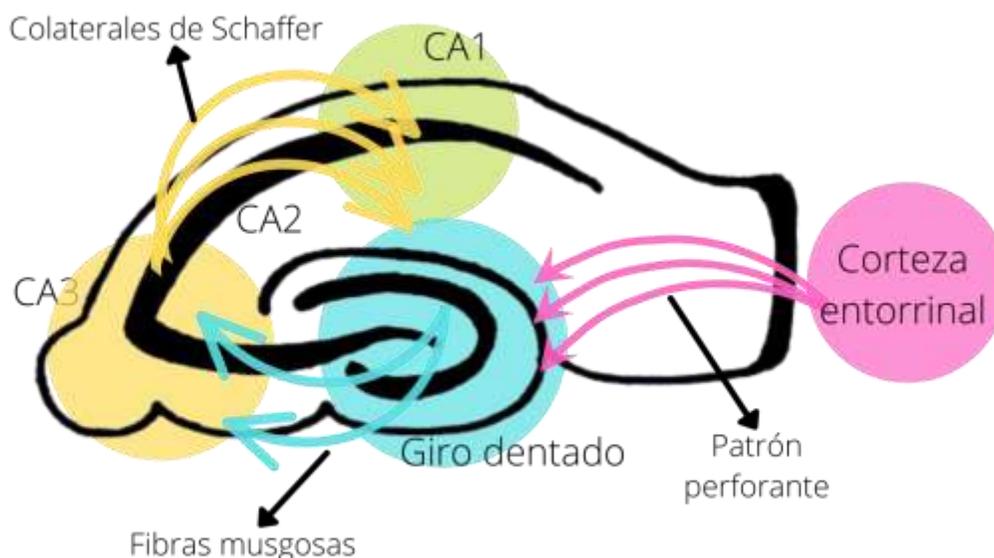


Figura 1. Esquema del circuito trisináptico. La corteza entorrinal (en rosa) envía proyecciones hacia las células granulares del giro dentado (azul) a través del patrón perforante. A partir del giro dentado surgen proyecciones hacia las neuronas piramidales de CA3 (amarillo), formando a las fibras musgosas. Finalmente se forman las colaterales de Schaffer que conectan a CA3 con CA1 (verde).

El hipocampo es esencial para la integración de información sensorial y la consolidación de la memoria (Eichenbaum, 2017). Específicamente, participa en la codificación de la memoria espacial y en la detección de la novedad (Ljungberg et al., 1992; O'Keefe, 1999). De hecho, se ha reportado que los circuitos intrínsecos del hipocampo son los encargados de detectar los cambios entre la información previamente almacenada y la información actual (Morris, 2006). Cuando se encuentran diferencias, se puede llevar a cabo un nuevo proceso de reconsolidación, permitiendo así la actualización de la información (Gálvez et al., 2022).

Desde hace mucho tiempo se han estudiado las propiedades de las neuronas hipocámpales que permiten la codificación de la navegación espacial y la memoria. En 1970, John O'Keefe y sus colegas, mostraron que muchas neuronas en el hipocampo responden de manera selectiva cuando los animales se encuentran en una localización conocida. El área que evoca la mayor respuesta neuronal

se conoce como el campo del lugar de la neurona y a estas neuronas se les llama células del lugar. Actualmente se ha demostrado que los campos del lugar son dinámicos y las células de lugar tienen la capacidad de alterar sus campos receptivos para ajustarse a las necesidades conductuales de un nuevo ambiente (Muzzio et al., 2009).

Por otro lado, se han identificado que las células de rejilla (grid cells) son neuronas espacialmente selectivas en la corteza entorrinal. Estas células responden cuando los animales se encuentran en una serie de lugares que en conjunto forman una reja hexagonal (Moser et al., 2008). Dado que la corteza entorrinal envía proyecciones hacia el hipocampo, existen modelos que proponen que los campos de las células de lugar resultan de la suma de la información entrante de las células de rejilla (Eichenbaum, 2017; Bethus et al., 2010). En general, la respuesta de ambos tipos celulares se basa en dónde el animal cree que está. A raíz de estas observaciones surgió la teoría del mapa cognitivo, propuesta por O'Keefe, que postula que el hipocampo integra y asocia los estímulos para generar un mapa espacial del ambiente en el que se encuentra un sujeto.

2.1 Evaluación de memoria espacial dependiente de hipocampo

La capacidad de aprender la localización espacial de un objeto o de uno mismo puede ser codificada por el cerebro a través del sistema de navegación aloentróico, donde se usan las claves externas al organismo. La navegación aloentróica involucra al hipocampo, la corteza entorrinal y estructuras aledañas. En los humanos, este sistema se encarga de la codificación de la memoria declarativa y participa en la formación de mapas cognitivos del ambiente donde se encuentran los organismos (Bear et al., 2020; O'Keefe, 1999).

Esta forma de memoria se evalúa en animales de laboratorio por varios métodos, uno de los más utilizados es el laberinto acuático de Morris (Morris Water Maze, MWM). Este laberinto fue diseñado en 1984 por Richard G Morris como un método para evaluar la memoria y el aprendizaje espacial en roedores (Morris, 1984).

El MWM (Fig. 2) consiste en una tina circular que se llena con agua fría y contiene una plataforma de escape sumergida (Rowan et al., 2017). Se agrega pintura al agua y se colocan claves contextuales en las paredes del laberinto. Durante el entrenamiento se coloca a los animales en posiciones de inicio aleatorias y se les permite nadar hasta que encuentren la plataforma. El objetivo es que los animales aprendan y recuerden la localización espacial de la plataforma.

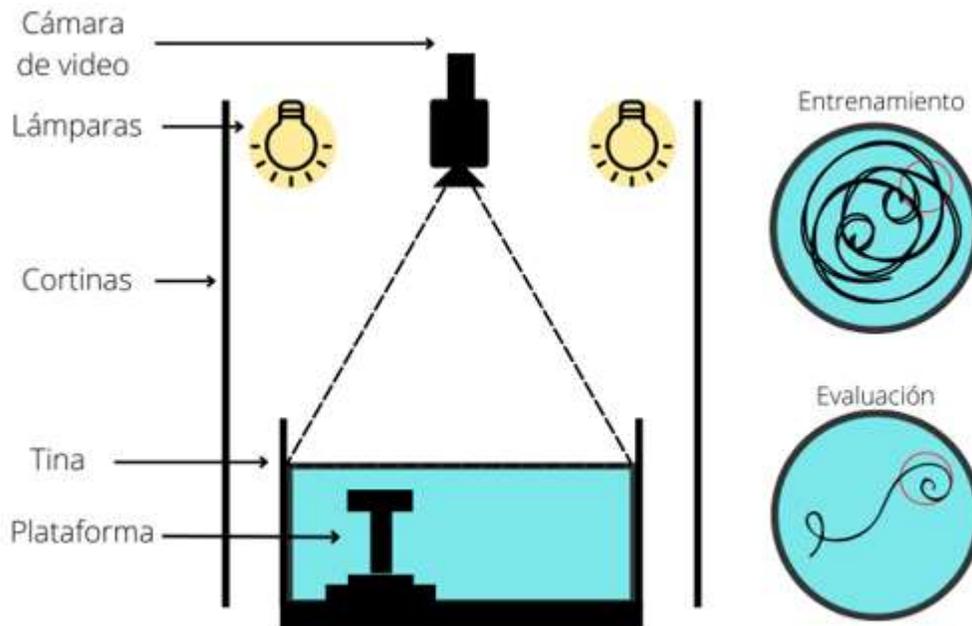


Figura 2. Esquema del laberinto acuático de Morris. Modificado de Morris, 1984.

El aprendizaje durante el entrenamiento en el MWM se registra a través de la disminución en el tiempo que le toma a cada animal llegar a la plataforma (latencia). El día de la evaluación se retira la plataforma y la memoria se determina por la preferencia de los animales a nadar en el cuadrante donde se encontraba la misma, así como el número de cruces en esta área y la latencia al primer cruce. De esta forma se puede evaluar la memoria espacial de manera robusta. Una de las ventajas de esta tarea es que el laberinto brinda la motivación necesaria para la búsqueda activa de una manera de salir del agua, a pesar de que los roedores son nadadores naturales. Además, al evaluar la velocidad de los animales se puede asegurar que todos los grupos son iguales en su habilidad para nadar y su motivación para encontrar la plataforma. Otra de las ventajas es que en esta tarea no hay necesidad de restricción de alimento y agua, como se hace en otro tipo de tareas conductuales (Vorhees y Williams, 2006). Por último, a pesar de que existen estudios que evalúan la MLP en diferentes periodos postentrenamiento y obtienen resultados favorables sobre la retención a largo plazo (Akers et al., 2014), se ha visto que la evaluación a las 24 horas después de concluir el entrenamiento resulta en un buen desempeño de los animales mientras que la evaluación a los 10 días o más puede ser deficiente (Patil et al., 2009). Además, la activación de las células de lugar y los mecanismos de plasticidad sináptica que ocurre durante el aprendizaje de esta tarea aumentan los niveles de transcripción de proteínas necesarias para la consolidación de la memoria (Redish y Touretzky 1998; McNamara y Skelton, 1993).

Debido a que la inmersión en el agua puede causar estrés, existen otro tipo de laberintos para la evaluación de la memoria espacial como BM (Barnes, 1979). Este laberinto consiste en una tabla

con agujeros laterales de los cuales solo uno lleva a un pequeño compartimento oscuro debajo del laberinto, los demás están cerrados (Fig. 3) (Pitts, 2018). Alrededor del laberinto se colocan claves contextuales y para los entrenamientos se coloca al animal en una caja en el centro del laberinto. A continuación, se libera y se le permite explorar el área hasta que encuentre el agujero objetivo. Posteriormente se puede evaluar la memoria de largo plazo (MLP) a las 24 horas o más. Durante la evaluación, se cierra el agujero objetivo y se registra el tiempo que los animales pasan en el cuadrante del agujero, el número de cruces al mismo y su latencia al primer cruce (Sharma et al., 2010). De esta forma se puede evaluar la persistencia de la memoria al registrar la preferencia de los animales por el agujero indicado. Igualmente se pueden medir otros parámetros como la velocidad promedio de los animales para asegurar que las diferencias se deben al aprendizaje adquirido. De manera similar al MWM, se ha visto que la evaluación a las 24 horas después de concluir el entrenamiento en este laberinto resulta en un buen desempeño de los animales mientras que la evaluación a los 10 días o más es deficiente (Illouz et al., 2016). Además, los mecanismos moleculares para la formación de la memoria espacial en esta tarea y la inducción de plasticidad sináptica son muy similares a los implicados en el MWM (Patil et al., 2009; Sadeghian et al., 2019).

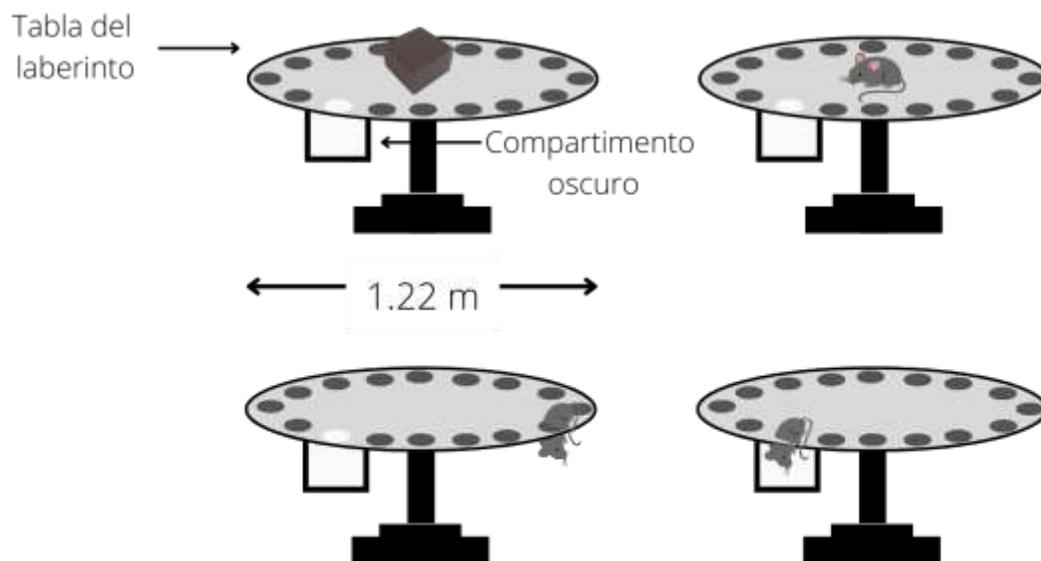


Figura 3. Esquema del laberinto de Barnes. Modificado de Barnes, 1979.

3. Plasticidad sináptica y memoria

Tras los postulados de Hebb, se estableció que las conexiones neuronales se fortalecen cuando dos células se activan al mismo tiempo, es decir, las neuronas que disparan juntas están conectadas entre sí (Nadel y Maurer, 2020). De esta forma, si una célula A participa persistentemente en el disparo de una célula B, entonces la fuerza de su conexión debe aumentar. Después de este proceso, si otro estímulo activa solo una fracción de las células del ensamble, las conexiones recíprocas que se fortalecieron provocan la activación del ensamble completo y la recuperación de la memoria (Magee y Grienberger, 2020). Entonces, durante el aprendizaje y la memoria el sistema nervioso es capaz de sufrir modificaciones estructurales y funcionales dependientes de actividad, denominados

plasticidad sináptica (Citri y Malenka, 2008). Así, la nueva información se incorpora a los trazos de memoria preexistentes. Se ha propuesto que el aprendizaje es el resultado directo de los cambios funcionales y morfológicos de las conexiones neuronales en áreas del sistema nervioso como el hipocampo (Kandel, 2001; Magee y Grienberger, 2020).

En 1973 los investigadores Bliss y Lomo obtuvieron la primera evidencia experimental de plasticidad sináptica en preparaciones *in vivo* de hipocampo de conejos. En su protocolo experimental, colocaron un electrodo en el patrón perforante y aplicaron una corriente eléctrica. Como resultado de la estimulación de alta frecuencia de estas fibras obtuvieron una respuesta intensa de las células de CA3 con las que las neuronas del giro dentado hacen sinapsis (Bliss y Gardner-Medwin, 1973). Además, las estimulaciones posteriores generaron una respuesta mayor a la obtenida antes de la estimulación inicial. A este fenómeno lo llamaron LTP. Esta potenciación fortalece la conexión entre las neuronas dentro del ensamble. Posteriormente se describió el proceso contrario, la depresión de largo plazo (LTD) que corresponde a la debilitación de las conexiones tras una estimulación de baja frecuencia (Domjan, 2007; Dietz y Manahan-Vaughan, 2017).

Actualmente, la LTP y LTD se consideran los mecanismos que subyacen al aprendizaje y a la memoria (Bliss y Gardner-Medwin, 1973; Dietz y Manahan-Vaughan, 2017). Algunos de los cambios estructurales que se generan tras la inducción de una LTP son el crecimiento de espinas dendríticas, alargamiento de espinas preexistentes, síntesis de nuevas proteínas, entre otros (Matsuzaki et al., 2004; Benson et al., 2000). Por lo tanto, la LTP puede ayudar a explicar la formación, estabilización y mantenimiento de las conexiones sinápticas. Se ha reportado que la estimulación de alta frecuencia de las neuronas presinápticas aumenta la cantidad de neurotransmisores liberada y esto puede llevar a una despolarización más fuerte de la célula postsináptica (Nicoll, 2017; Nishizaki, 2017). Además, se genera un aumento en el número de receptores en las terminales postsinápticas, así como un cambio en la responsividad celular (Lombroso y Ogren, 2009). Incluso, se ha visto que un déficit en los procesos de plasticidad en el hipocampo involucra problemas en el desempeño de muchas tareas de memoria episódica (Lynch, 2004).

Algunas de las características esenciales de la plasticidad de largo plazo, LTP o LTD, son: la cooperatividad, asociatividad, especificidad y larga duración. La cooperatividad consiste en que se puede lograr la inducción de LTP por la activación de cierto número crítico de sinapsis al mismo tiempo (Citri y Malenka, 2008). Por otro lado, la asociatividad se refiere a la capacidad de potenciar un input débil cuando éste se activa en asociación con uno fuerte. La especificidad nos habla de que solo ocurrirá una LTP en las sinapsis activadas (Lombroso y Ogren, 2009). Por último, la duración de largo plazo de estos tipos de plasticidad sináptica sugiere que estos procesos podrían ser la forma en la que las células almacenan la información (Domjan, 2007).

Existe un umbral para la generación de plasticidad sináptica que se ajusta según la actividad postsináptica. De esta forma, si la estimulación ocurre al mismo tiempo que una fuerte despolarización postsináptica, entonces se genera una LTP en las sinapsis activas. Por otro lado, si la estimulación ocurre al mismo tiempo que una despolarización postsináptica débil o moderada, entonces se genera una LTD en las sinapsis activas (Bear et al., 2020). A este proceso de modificación de la probabilidad de inducción de cierto tipo de plasticidad dependiendo de la historia previa de las sinapsis se le denomina metaplasticidad (Eichenbaum, 2017). Además, cuando hay un aumento en la actividad neuronal debido a una LTP, el umbral de generación de plasticidad aumenta, es decir,

se vuelve más difícil producir otra LTP (Citri y Malenka, 2008). De forma similar, cuando bajan los niveles de actividad por una LTD se disminuye el umbral de modificación lo que baja la probabilidad de inducción de otra LTD y aumenta la probabilidad de producir una LTP.

3.1 Mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica

Muchos de los cambios que ocurren durante la plasticidad sináptica involucran a diferentes receptores en el cerebro. La mayoría de la transmisión excitatoria es mediada por los receptores glutamatérgicos. Este tipo de receptores se subdivide en receptores ionotrópicos (canales iónicos) y metabotrópicos (acoplados a proteínas G). Entre los receptores ionotrópicos se encuentran los receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropanóico (AMPA) y los N-metil-D-aspartato (NMDA), ambos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso y permiten la entrada de iones como sodio y calcio al ser activados (Meldrum, 2000). Los receptores NMDA juegan un papel importante durante los procesos de LTP en el hipocampo (Volianskis et al., 2015). En estado basal, el canal de estos receptores se encuentra bloqueado por magnesio. Cuando la neurona postsináptica se despolariza, el cambio en el potencial de membrana retira el magnesio del canal y de esta manera se permite la entrada de calcio para la inducción de una LTP. Por esta razón se considera que la activación de los receptores NMDA funciona como detector de la coincidencia de activación de la neurona presináptica y la postsináptica (Tsien et al., 1996).

Durante los procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo, ocurre una inserción de nuevos receptores AMPA en las células postsinápticas (Shi et al., 2001). Asimismo, durante la LTP se aumenta la conductancia de los canales de estos receptores en las sinapsis activas (Lisman et al., 2012). La fosforilación de los receptores AMPA por la proteína cinasa A (PKA) es uno de los mecanismos que aumenta la probabilidad de apertura del canal (Lombroso y Ogren, 2009). De esta forma se pueden estabilizar los cambios en la eficiencia sináptica producidos por la LTP o LTD.

Asimismo, se ha visto que la alteración farmacológica o genética de la transmisión glutamatérgica hipocámpal genera déficits importantes en el desempeño de tareas de memoria espacial y procesos de plasticidad (Tsien et al., 1996; Morris et al., 1986). Por ejemplo, la administración de antagonistas de los receptores NMDA o la ausencia de alguna de sus subunidades en CA1 bloquea la inducción de una LTP (Citri y Malenka, 2008). Además, la sobreexpresión de la subunidad NR2B de los receptores NMDA mejora su función y la inducción de una LTP, facilitando el aprendizaje espacial (Citri y Malenka, 2008; Tang et al., 1999; Martin et al., 2000). La experiencia genera directamente cambios estructurales en las neuronas corticales como la activación de sinapsis silentes, las cuales originalmente no contienen receptores AMPA. Esto puede ser otra de las bases celulares que subyacen al aprendizaje y la memoria (Matsuzaki et al., 2004; Barnett et al., 2018; Nicoll, 2017).

En el hipocampo, el aprendizaje de una tarea de memoria espacial es capaz de generar los mismos cambios a nivel de receptores glutamatérgicos que la inducción de LTP por la estimulación eléctrica de alta frecuencia (Whitlock et al., 2006). Asimismo, genera un aumento en la amplitud de la transmisión sináptica y en la pendiente de los potenciales excitatorios postsinápticos de campo (fEPSP) en CA1 *in vivo* (Nakahata y Yasuda, 2018). La LTP en el hipocampo promueve la formación de trazos de memoria a través de la generación de “etiquetas” sinápticas (synaptic tags), las cuales son marcadores hipotéticos de los cambios estructurales que subyacen los procesos de aprendizaje

(James et al., 2020). La formación de estas etiquetas inicia con una potenciación de corto plazo en las espinas postsinápticas, generando un marcador molecular que puede reclutar factores de transcripción y permitir el almacenamiento y la consolidación de la memoria (Moncada, 2017; Matsuzaki et al., 2004). Igualmente, el aumento de las concentraciones intracelulares de calcio activa diversas vías de señalización como la vía de la calcio-calmodulina cinasa II (CaMKII) que participa en la activación de factores de transcripción como c-fos (Benson et al., 2000; Lynch, 2004; Lisman et al., 2012). Esta proteína activa a otras proteínas cinasas (Lisman et al., 2012) que promueven la síntesis e inserción de nuevos receptores AMPA en la membrana, incrementando la eficiencia sináptica (Shi et al., 2001; Barnett et al., 2018). Se sabe que CaMKII puede autofosforilarse para mantenerse activa independientemente de las concentraciones de calcio intracelular. Todos estos mecanismos moleculares son responsables del aumento de la fuerza sináptica que ocurre durante la creación de un engrama de memoria espacial (Dietz y Manahan-Vaughan, 2017). Por lo tanto, en la memoria y el aprendizaje los procesos conductuales y electrofisiológicos en el hipocampo se encuentran ligados.

La actividad de las neuronas del hipocampo puede ser regulada por otros neurotransmisores y moléculas que funcionan como neuromoduladores. De esta forma se facilita o se inhibe la activación de determinadas cascadas de señalización que generan los cambios plásticos responsables de determinada conducta o aprendizaje. Entre los neuromoduladores hipocampales más importantes se encuentran las catecolaminas (Citri y Malenka, 2008).

4. Catecolaminas

Las catecolaminas son un grupo de neurotransmisores formado por DA, NE y epinefrina. Estos neurotransmisores contienen el grupo catecol dentro de su estructura molecular y se sintetizan a partir del aminoácido tirosina por medio de la enzima tirosina hidroxilasa (TH). La TH utiliza biopterina como cofactor y cataliza la adición de un grupo hidroxilo para formar L-dopa. Esta, a su vez, se convierte en DA por medio de la L-dopa-descarboxilasa. Finalmente se obtiene NE por acción de la dopamina-beta hidroxilasa. La epinefrina se puede sintetizar a partir de NE por acción de la feniletanolamina N-metiltransferasa (Fernstrom y Fernstrom, 2007).

Las catecolaminas pueden regular la actividad neuronal a través de interacción con ciertas proteínas, así como la activación o inhibición de la proteína adenilato ciclasa (Otmakhova y Lisman, 1996). Por un lado, sabemos que la liberación de NE en el cerebro activa a los adrenoreceptores alfa 1 y 2 (acoplados a proteínas Gi, por lo tanto, tienen actividad inhibitoria) y beta 1, 2 y 3 (acoplados a proteínas Gs, con actividad excitatoria). Asimismo, la liberación de DA activa a los receptores dopaminérgicos de la familia D1, formados por los receptores D1 y D5 (actividad excitatoria, acoplados a proteínas Gs), y de la familia D2 formados por los receptores D2, D3 y D4 (acoplados a proteínas Gi, con actividad inhibitoria). Las catecolaminas son removidas de la hendidura sináptica por medio del transportador de DA (DAT) o el de NE (NET).

Para la formación de cierto tipo de memorias declarativas, como la de reconocimiento espacial, es importante la detección de la novedad contextual. En este sentido, se propone que las catecolaminas están involucradas en la detección de la información familiar y novedosa (Moncada

y Viola 2007; Wang et al., 2019), la formación de la memoria espacial (Kempadoo et al., 2016; Sun et al., 2011; Wang et al., 2019) y las conductas motivadas (Murchison et al., 2011).

4.1 Regulación catecolaminérgica en el hipocampo

Como se establece anteriormente, la detección y procesamiento de la información contextual y la configuración espacial dependen del hipocampo (Li et al., 2003). Se ha visto que hay un aumento en los niveles de DA y NE en el hipocampo tras presentación de una configuración espacial novedosa durante la tarea de OLM (Moreno-Castilla et al., 2017). Además, la depleción de las terminales catecolaminérgicas en el hipocampo dorsal a través de la administración de 6-hidroxi-DA (6OHDA), el cual es un compuesto neurotóxico selectivo para las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, afecta la memoria espacial en OLM. Entonces, se establece que tanto la DA como la NE en el hipocampo modulan la memoria contextual (Moreno-Castilla et al., 2018). Durante la actualización de una memoria espacial la NE participa en la evocación de la configuración contextual original y la DA en la integración de la nueva información (Gálvez et al., 2022).

La actividad catecolaminérgica en el hipocampo activa vías de señalización relacionadas con plasticidad sináptica como la vía de PKA/CREB que se encarga de la modificación de las interacciones sinápticas para lograr un fortalecimiento de la memoria (Bethus et al., 2010). De esta forma se puede modular la codificación, consolidación y recuperación de la memoria dependiente del hipocampo. Además, se ha establecido que la tasa de disparo de las neuronas hipocámpales es capaz de regular las diferentes formas de plasticidad sináptica y la transcripción de proteínas relacionadas con la plasticidad (Frey et al., 1990; James et al., 2020). Existen estudios que proponen que la co-liberación de DA y NE puede controlar la transcripción y traducción proteica, modulando directamente los mecanismos de plasticidad en el hipocampo (Maity et al., 2016; Bliss et al., 1983; Moncada, 2017; Frey et al., 1991).

4.2 Dopamina

La DA participa en la regulación de la toma de decisiones basadas en el valor de los estímulos y su saliencia, facilitando la formación de memorias asociativas (da Silva et al., 2012; Kempadoo et al., 2016; Xing et al., 2010; Smith y Greene, 2012). Conductualmente, la activación de los receptores de la familia D1 es necesaria para la codificación y persistencia de memorias episódicas dependientes del hipocampo (Smith y Greene, 2012; Otmakhova y Lisman, 1996; Lisman y Otmakhova, 2001). Asimismo, se ha demostrado que la mutación de los receptores D1 evita la adquisición de una memoria espacial (Xing et al., 2010). Mientras que la administración de agonistas de estos receptores en el hipocampo mejora la MLP y genera un aumento en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios registrados *in vitro* e *in vivo* (Frey et al., 1990; Bethus et al., 2010). Por el contrario, la administración de antagonistas de los receptores D1/5 en CA1 evita la formación de la memoria espacial en el MWM y la inducción de una LTP (da Silva et al., 2012; Huang y Kandel, 1995; Jay, 2003; Frey et al., 1991; O'Carroll et al., 2006). Por lo tanto, estos receptores tienen un papel esencial en el procesamiento de memoria espacial en el hipocampo.

La señalización dopaminérgica participa activamente en la generación de mapas cognitivos hipocampales. Se ha demostrado que la estabilidad a largo plazo de los campos de las células de lugar se correlaciona con la demanda atencional de las tareas conductuales (Muzzio et al., 2009). Experimentalmente, se ha reportado un aumento en la estabilidad de los campos de lugar de estas neuronas tras la administración de un agonista de receptores D1/5 (Kentros et al., 2004; Lisman et al., 2011). Así, la actividad dopaminérgica es esencial para la codificación de la configuración espacial y el contexto.

Específicamente, la activación de los receptores de la familia D1, activan proteínas Gs que provocan la activación de la enzima adenilato ciclasa. Esta enzima sintetiza monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) a partir de adenosín trifosfato (ATP) (Huang y Kandel, 1995; Frey et al., 1990; Frey et al., 1993). El AMPC activa a PKA la cual fosforila, entre otros sustratos, a las subunidades de receptores AMPA (Lombroso y Ogren, 2009). De igual manera, promueve la translocación de una de las subunidades catalíticas del receptor al interior del núcleo. Este proceso inicia una cascada de fosforilación que lleva a la activación de factores de transcripción como la proteína de unión responsiva a AMPC (CREB) (Jay, 2003). Esta cadena de señalización, como se describe en secciones anteriores, interviene en la modulación de los genes implicados en el mantenimiento de la plasticidad sináptica.

La DA también puede mejorar la respuesta mediada por receptores NMDA y regular directamente la excitabilidad dendrítica a nivel postsináptico (de Bundel et al., 2013). La actividad conjunta de DA y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) lleva a la activación de la proteína cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) que regula la traducción, estimula la función ribosomal y aumenta la expresión de los receptores AMPA en las sinapsis estimuladas (Lisman et al., 2011; Smith y Greene, 2012). Por lo tanto, estas evidencias demuestran que la activación de vías dopaminérgica es importante para la síntesis de proteínas necesarias para la plasticidad (Kandel, 2001; Wang et al., 2010; Otmakhova y Lisman, 1996; Huang y Kandel, 1995; da Silva et al., 2012).

De manera puntual, la administración de DA en rebanadas de hipocampo, en CA1 genera un cambio a nivel poblacional que se mantiene por varias horas. Este cambio está asociado a un aumento en la amplitud de la respuesta a los pulsos de corriente y en la actividad espontánea de las neuronas hipocampales (Gribkoff y Ashe, 1984). Así, la DA es capaz de inducir modificaciones duraderas de la excitabilidad neuronal en CA1.

Finalmente, la DA en el hipocampo puede generar ráfagas de disparos en respuesta a estímulos asociados a una recompensa o a un nuevo estímulo altamente saliente (Lisman y Otmakhova, 2001; Ljungberg et al., 1992; Wise, 2004). Además, se ha visto que el emular esta actividad de disparo es suficiente para inducir un condicionamiento conductual (Lisman et al., 2011). Por esta razón se considera que la DA juega un papel importante en la consolidación de memorias hipocampales. Existen estudios de resonancia magnética funcional (fMRI) y tomografía por emisión de positrones (PET) donde se ha confirmado que, en humanos, ocurre una activación de centros dopaminérgicos en el cerebro debido a la presentación de estímulos novedosos (Krebs et al., 2009; Zald et al., 2008).

4.3 Norepinefrina

La NE está involucrada en la regulación atencional, emocional y en los procesos de memoria y aprendizaje. Se ha demostrado que la activación de los receptores beta-adrenérgicos puede mejorar la memoria a través de la cascada de señalización acoplada a las proteínas Gs que se describe anteriormente (Hu et al., 2007). Por otro lado, la disminución de la liberación de NE o el bloqueo de los receptores beta-adrenérgicos afecta la memoria dependiente de hipocampo (Murchison et al., 2004). La modulación noradrenérgica participa en la recuperación, reactivación y reconsolidación de la memoria espacial durante estados fisiológicos como el sueño y la atención (Gálvez et al., 2022; Sara, 2010; Muzzio et al., 2009). La liberación de NE en el hipocampo facilita los “Sharp wave ripples” (SWR) tanto en CA1 como CA3. Los SWR son patrones oscilatorios de actividad neuronal que se pueden registrar en electroencefalogramas (EEG). El aumento de los SWR en CA1 y CA3 se asocia con una mejor consolidación de la memoria (Sara, 2010).

Desde hace tiempo se propone que el proceso de formación de una MLP se basa en el etiquetado de las conexiones que codifican el aprendizaje y en la síntesis de las proteínas necesarias para la consolidación (Hansen, 2017; Moncada, 2017). La NE puede inducir plasticidad sináptica en el hipocampo y participar de manera importante en la persistencia de la LTP a través de las cascadas de señalización ligadas a la activación de ERK y el target en mamíferos de la rapamicina (mTOR). (Frey et al., 2001). La unión de NE a sus receptores en el hipocampo recluta la maquinaria de transcripción y participa en la activación de mecanismos epigenéticos para la generación y modificación de proteínas (Maity et al., 2016; Hansen, 2017; Gelinás et al., 2007). Los mecanismos anteriores son clave para la LTP y la consolidación de la MLP dependiente de hipocampo. Además, la NE aumenta la espiga poblacional y los potenciales postsinápticos excitatorios de las células granulares del giro dentado (Neuman y Harley, 1983). La duración de estos cambios en la fuerza sináptica disminuye si se elimina la señalización dada por NE (Bliss et al., 1983). Por lo tanto, este neurotransmisor contribuye a la estabilización de una memoria a través de la inducción de una LTP persistente.

5. Locus Coeruleus

El LC es una estructura catecolaminérgica, localizada en el tallo cerebral, implicada en la regulación de los estados de atención, aprendizaje y memoria, ansiedad, entre otros (Kelly et al., 2017; Sara y Devauges, 1988). Es el origen del sistema noradrenérgico y envía proyecciones hacia el tálamo, la amígdala, la neocorteza y el hipocampo (Loughlin et al., 1986; Devoto et al., 2005; Kawahara et al., 2001). Anteriormente se creía que el área tegmental ventral (VTA) era la fuente principal de DA en el hipocampo. Sin embargo, se ha demostrado que la densidad de proyecciones del LC hacia el hipocampo dorsal es mucho mayor que la proveniente del VTA (Takeuchi et al., 2016; Kempadoo et al., 2016; Gálvez et al., 2022). Además, la activación eléctrica o farmacológica del LC provoca un aumento de los niveles de DA y NE en el hipocampo y mejora la transmisión sináptica (Takeuchi et al., 2016; Kempadoo et al., 2016; de Bundel et al., 2013). Se ha demostrado que esta estructura participa en todas las etapas de la formación de la memoria dependiente de esta región (James et al., 2020; Takeuchi et al., 2016; Kempadoo et al., 2016).

Las neuronas del LC pueden disparar potenciales de acción en respuesta a la novedad (Lemon y Manahan-Vaughan, 2012; Vankov et al., 1995; Kaufman et al., 2020). Además, responde a los estímulos sensoriales asociados con un estímulo intenso o nocivo (Vankov et al., 1995). Las lesiones bilaterales al LC pueden afectar la codificación y consolidación de la memoria espacial (Zornetzer y Gold, 1976). Finalmente, disminuir la expresión de TH en el LC o bloquear a NET evita la mejora en la respuesta sináptica mediada por la DA en el hipocampo (de Bundel et al., 2013; James et al., 2020; Zornetzer y Gold, 1976; Atzori et al., 2016). Mientras que la liberación de NE ante la presentación de una experiencia novedosa lleva a un aumento en el aprendizaje espacial junto con la facilitación de la inducción de plasticidad sináptica en el hipocampo (Hansen y Manahan-Vaughan, 2015; Moncada, 2017; Lemon et al., 2009). Por esta razón se establece que el LC tiene un papel fundamental en la modulación catecolaminérgica en el hipocampo.

Las memorias consolidadas pueden ser actualizadas a través de un proceso que requiere de su reactivación y la integración de la nueva información. Los procesos de actualización de la memoria y reconsolidación también son modulados por el sistema catecolaminérgico del LC en el hipocampo (Gálvez et al., 2022; Hansen, 2017; Wang, 2018). Además, este proceso puede ser alterado al disminuir la señalización catecolaminérgica en esta vía. En trabajos de nuestro grupo, se ha visto que la inhibición optogenética de las terminales del LC afecta la actualización de la memoria en una tarea de reconocimiento espacial debido a la disminución de la concentración extracelular de DA y NE en CA1, y afecta el desempeño conductual de los animales. (Gálvez et al., 2022). Además, en otros estudios se ha visto que la activación optogenética de las terminales del LC que llegan a CA1 aumenta la actividad de las células de lugar activadas durante el desempeño de una tarea de memoria dirigida a metas, mientras que la inhibición de la vía suprime los efectos observados (Kaufman et al., 2020).

La actividad catecolaminérgica del LC contribuye al proceso de formación de la memoria a través de la inducción de plasticidad sináptica (James et al., 2020; Yavich et al., 2005; Devauges y Sara, 1991; Lemon y Manahan-Vaughan, 2012). La estimulación eléctrica de alta frecuencia del LC antes de la adquisición de la memoria facilita la recuperación de la información (James et al., 2020; Yavich et al., 2005; Devauges y Sara, 1991; Hansen, 2017; Devoto et al., 2005). Se ha visto que esto puede mejorar la respuesta a los estímulos salientes y los potenciales de acción poblacionales en el giro dentado evocados por la estimulación del patrón perforante (Devauges y Sara, 1991). Asimismo, la estimulación optogenética de las terminales del LC al giro dentado es suficiente para lograr la inducción de una LTP débil (Quinlan et al., 2019). Por otro lado, la inhibición optogenética de la vía LC-CA1 suprime la LTP registrada en las neuronas de CA1 después de la estimulación de alta frecuencia y produce una LTD. Por lo tanto, la modulación dada por las catecolaminas liberadas desde LC- CA1 es esencial para la regulación de la plasticidad sináptica. Incluso se postula que la actividad catecolaminérgica del LC participa en procesos de metaplasticidad al ajustar el umbral de activación para la inducción de LTP o LTD y establecer un balance en el hipocampo (James et al., 2020).

6. Optogenética

La optogenética es una técnica que utiliza la estimulación óptica con modificaciones genéticas para producir cambios en la función de células específicas en un momento determinado *in vivo* (Yizhar et al., 2011). Esto se logra a través de la introducción de una opsina microbial, la cual es una proteína de membrana transportadora de iones sensible a la luz. La expresión de esta proteína se dirige a ciertas neuronas para controlar su actividad excitatoria-inhibitoria utilizando una longitud de onda específica (Boyden et al., 2005). Las opsinas se han aislado, adaptado y refinado para permitir su expresión en células de mamíferos y poder modular su actividad por medio de la inducción de despolarización o hiperpolarización de la membrana.

La rodopsina más utilizada para controlar la actividad excitatoria de ciertas células es la proteína canal de rodopsina (channelrodopsin (ChR)). Esta proteína es un canal selectivo de cationes como sodio, hidrógeno, potasio y calcio descrito por primera vez por Nagel y Hegemann en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel et al., 2003). La activación de ChR a través de la estimulación a 473 nm permite la despolarización de la membrana (Barnett et al., 2018; Xie et al., 2013). La activación de ChR y su inserción en la membrana celular no altera las propiedades eléctricas intrínsecas de la célula ni su potencial de reposo por lo que no compromete la integridad o la funcionalidad neuronal (Xie et al., 2013). Esta opsina es codificada por un marco abierto de lectura (ORF) de solo 315 aminoácidos por lo que se puede expresar en subpoblaciones neuronales a través de métodos genéticos como vectores virales y animales transgénicos (Boyden et al., 2005). Por otro lado, la proteína halo rodopsina (NpHR) tiene actividad de bombas de cloro induciendo la hiperpolarización de la célula con otra longitud de onda, 523nm (Xie et al., 2013). Así, se logra la inhibición de la célula de manera precisa.

Los genes que codifican para las opsinas pueden ser administrados a las células de interés mediante transfección, traducción viral o la creación de animales transgénicos (Yizhar et al., 2014). El uso de vectores virales se basa en la infusión en una región cerebral específica de un lentivirus o un virus adenoasociado (AAV) (Xie et al., 2013). Los AAV, al ser más pequeños, pueden difundirse más lejos y llegar a los núcleos celulares. Además, tienen una capacidad de almacenamiento máximo de 4kb. Por otro lado, la expresión selectiva dentro de un fenotipo neuronal determinado se logra al utilizar un promotor dentro del vector viral. Adicionalmente el uso de animales transgénicos con la proteína Cre recombinasa asegura la expresión de las opsinas a niveles funcionalmente importantes dentro de tipos celulares específicos. La proteína Cre es una enzima bacteriana que se utiliza para la recombinación de secuencias de DNA entre dos sitios específicos llamados sitios loxP. Finalmente, se coloca la fibra óptica en una región determinada (Fig. 4). De esta forma se logra la alta especificidad de estimulación y el control preciso de la actividad neuronal *in vivo*, lo cual nos permite estudiar los mecanismos de plasticidad y sus consecuencias conductuales. Esto sería difícil de lograr con técnicas tradicionales como electrofisiología o farmacología, que representan aproximaciones más invasivas.

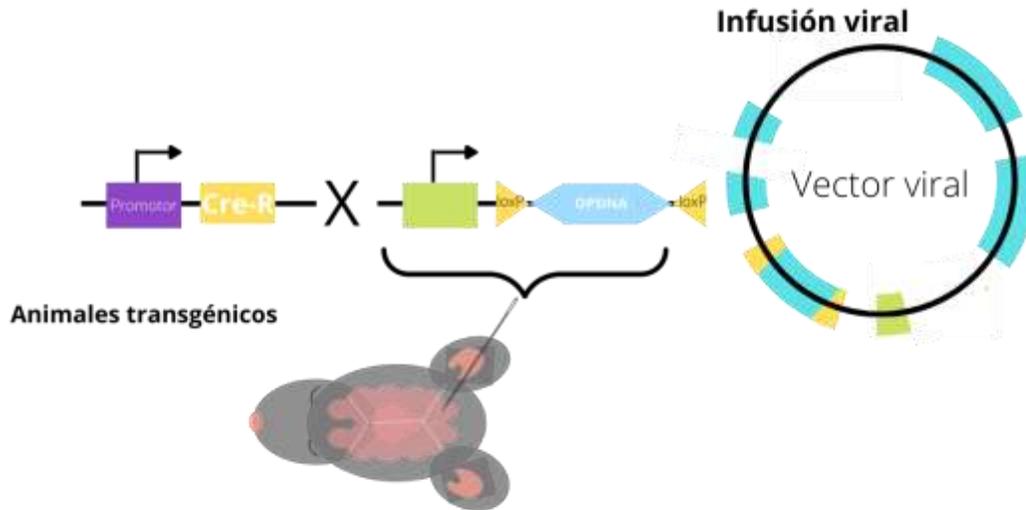


Figura 4. El uso de vectores virales infundidos en regiones cerebrales específicas de animales transgénicos permite la expresión de opsinas en tipos celulares específicos. Los animales expresan a la proteína Cre-R bajo el promotor de alguna otra proteína que va a determinar el tipo de neuronas que se van a activar. Se realiza la infusión de un vector viral que contiene a la opsina flanqueada por sitios loxP que son reconocidos por la proteína Cre para lograr la recombinación.

6.1 Optogenética en el LC

Utilizando la técnica de optogenética se han estudiado los mecanismos de plasticidad sináptica en el LC- CA1. Se ha visto que la activación optogenética de la vía puede imitar el efecto obtenido por la novedad sobre la persistencia de la memoria (Takeuchi et al., 2016). Este efecto es dependiente de los receptores dopaminérgicos D1/5 (Fig. 5) (Tsetsenis et al., 2022; Takeuchi et al., 2016). Además, en experimentos ex vivo, se observa un aumento en las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) de las neuronas piramidales de CA1 ante la estimulación optogenética de las terminales catecolaminérgicas del LC (Takeuchi et al., 2016; Walling y Harley, 2004). Esto nos indica que la despolarización de esta vía por estimulación optogenética es capaz de mejorar la transmisión sináptica a través de la liberación de DA y NE. Adicionalmente, la estimulación optogenética de las terminales del LC en el hipocampo puede aumentar la tasa de aprendizaje de una tarea de memoria espacial como el laberinto de Barnes (Kempadoo et al., 2016). La foto-estimulación de LC- CA1 también mejora la adquisición del aprendizaje asociativo contextual dependiente de receptores betaadrenérgicos (Tsetsenis et al., 2022).

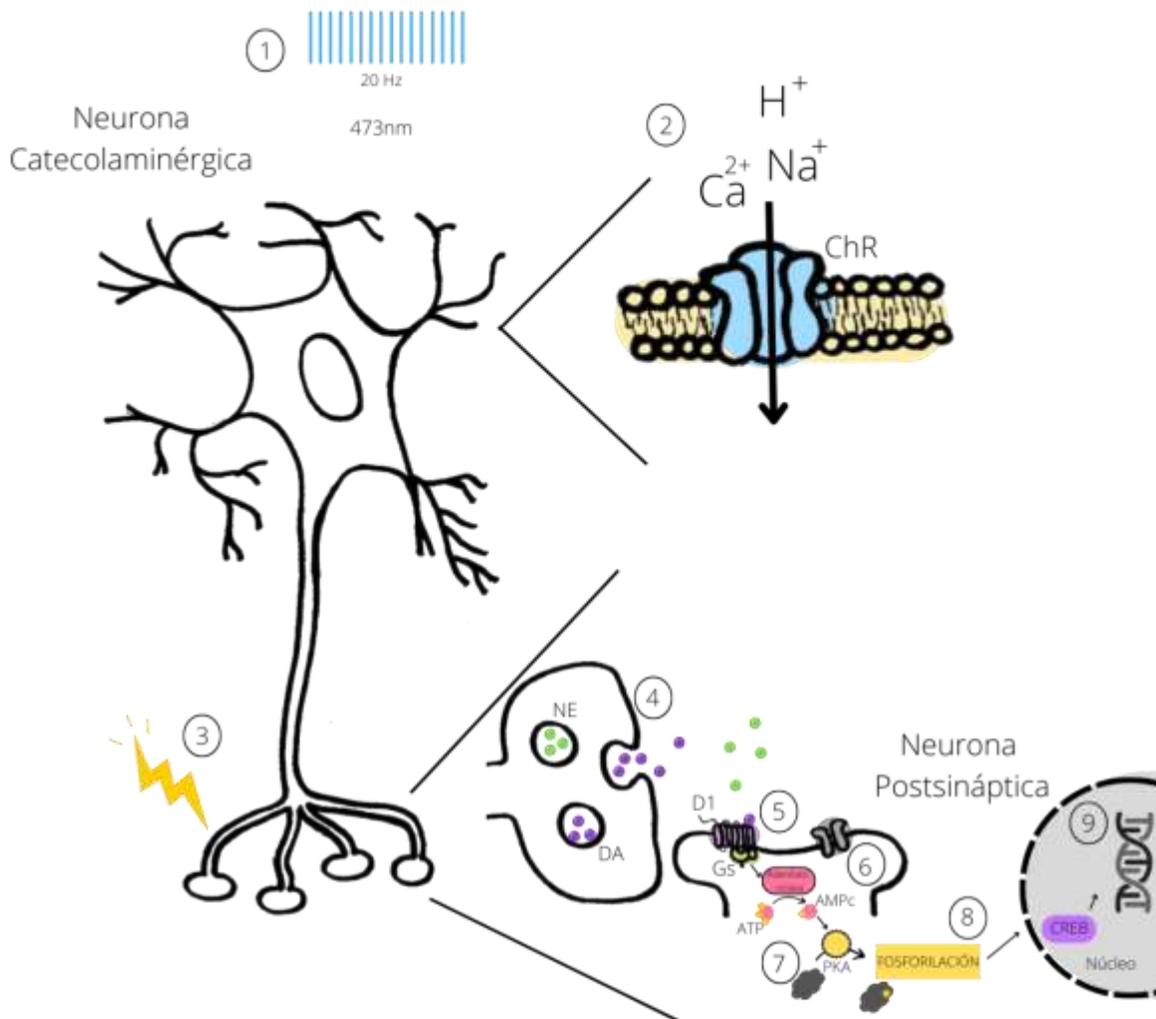


Figura 5. Mecanismos moleculares de la estimulación optogenética de las fibras catecolaminérgicas. 1. Se realiza la estimulación de 20 Hz frecuencia en las terminales catecolaminérgicas que codifican la proteína ChR con pulsos de 473 nm. 2. La proteína ChR es un canal que se inserta en la membrana celular y permite la entrada de cationes a la neurona, lo que favorece la despolarización. 3. Ocurre la despolarización celular y esto favorece la liberación de neurotransmisores en las terminales sinápticas. 4. Las neuronas catecolaminérgicas liberan DA y NE a la hendidura sináptica. 5. Estos neurotransmisores se unen a sus receptores D1 y beta-adrenérgicos, respectivamente, en la neurona postsináptica. Estos receptores se encuentran ligados a proteínas Gs. 6. Las proteínas Gs activan a la adenilato ciclasa que sintetiza AMPc a partir de ATP. 7. El AMPc activa a PKA, la cual fosforila diversas proteínas. 8. La fosforilación de ciertos sustratos de la PKA provoca la activación de factores de transcripción como CREB. 9. Los factores de transcripción en el núcleo estimulan la síntesis de proteínas necesarias para la plasticidad sináptica.

En general, los circuitos que median el aprendizaje contextual en el hipocampo pueden regular la excitabilidad neuronal local y la plasticidad sináptica. Además, como se expone en las secciones anteriores, se ha visto que las proyecciones dopaminérgicas del cerebro medio modulan la actividad sináptica en CA1 (Rosen et al., 2015) y promueven la retención de la memoria espacial (McNamara et al., 2014). Por lo tanto, el uso de optogenética en el estudio de la plasticidad sináptica en la vía del LC-CA1 permite la estimulación precisa y controlada de los circuitos catecolaminérgicos. De esta manera podemos estudiar las consecuencias en la conducta de los animales de forma menos invasiva que la inducción eléctrica.

7. Relevancia del estudio de la vía LC-CA1

La relevancia de esta vía recae en estudios donde se ha reportado una reducción importante de las catecolaminas en enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Moreno-Castilla et al., 2018; Guzmán-Ramos et al., 2022). De hecho, se ha reportado una alteración en la distribución y densidad de receptores dopaminérgicos y noradrenérgicos en regiones hipocampales como el giro dentado de pacientes en etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer (Guzmán-Ramos et al., 2022). La pérdida de la inervación catecolaminérgica proveniente del LC hacia el hipocampo ha sido reportada en pacientes con deterioro cognitivo moderado a severo, con 30% de pérdida neuronal (Theofilas et al., 2017). Asimismo, se ha visto que en pacientes diagnosticados con Alzheimer existe una degeneración de hasta el 50% de las neuronas catecolaminérgicas del LC (James et al., 2020). Esta reducción neuronal se asocia con un aumento en las placas amiloides y la carga de novillos neurofibrilares (Theofilas et al., 2017). Igualmente se correlaciona con el inicio y la duración de la enfermedad (Kelly et al., 2017). Por esta razón se estipula que la pérdida de la regulación catecolaminérgica sobre el hipocampo contribuye a los déficits de memoria característicos de estas enfermedades (Guzmán-Ramos et al., 2022). Por lo tanto, el LC es una estructura esencial para la memoria declarativa que se afecta en enfermedades neurodegenerativas.

El estudio de esta vía puede ayudar al entendimiento de los mecanismos afectados y al desarrollo de tratamientos para este tipo de enfermedades. Por ejemplo, se han reportado déficits en el desempeño de tareas de memoria espacial como el MWM en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer (Bromley-Brits et al., 2011). Asimismo, el grupo de Roy et al, en 2016 observó que la activación optogenética de las células hipocampales del giro dentado en la enfermedad de Alzheimer mejora la memoria. Esto está asociado con la restauración parcial de la densidad de espinas dendríticas en esta área y la inervación del patrón perforante (Roy et al., 2016).

Por otro lado, sabemos que la DA y la NE modulan las funciones cognitivas superiores (Atzori et al., 2016). La disminución en la transmisión catecolaminérgica también está asociada a psicopatologías como la depresión (Devoto y Flore, 2006; Zornetzer y Gold, 1976). Incluso, se ha demostrado que la aplicación de DA y NE en el hipocampo dorsal tiene efectos importantes sobre la etiología de esta enfermedad (Guiard et al., 2008; Kawahara et al., 2001; Xie et al., 2013). Se ha visto que la desipramina, que es una droga antidepressiva con gran selectividad por NET, inhibe la recaptura de catecolaminas y prolonga el efecto de la DA aplicada exógenamente al hipocampo. Esta acción es importante para el tratamiento de los síntomas cognitivos en enfermedades psiquiátricas (Borgkvist et al., 2012).

Finalmente, la disfunción de la transmisión catecolaminérgica en el LC durante estados de estrés y angustia pueden llevar a la generación de ciertos tipos de plasticidad mal-adaptativa que genera otro tipo de enfermedades como psicosis, desórdenes de ansiedad y déficit de atención (Atzori et al., 2016). Por lo tanto, la actividad catecolaminérgica del LC es importante en la relación entre la respuesta conductual y los mecanismos biológicos de corto y largo plazo.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO

El almacenamiento de la memoria puede ser a corto o a largo plazo. El proceso de consolidación permite la formación de trazos de memoria que se establecen en el hipocampo y la neocorteza. El circuito trisináptico es esencial para el procesamiento, codificación y almacenamiento de la memoria espacial, el contexto y la detección de la novedad. La memoria espacial se puede evaluar a través del MWM y el BM. El aprendizaje de ambas tareas genera cambios plásticos. De esta forma, las conexiones entre las células se fortalecen, contribuyendo a la LTP.

La actividad del hipocampo puede ser regulada por neuromoduladores como las catecolaminas. La DA y NE generan cambios al interior de las células y regulan la transcripción de proteínas necesarias para la plasticidad. La unión de las catecolaminas a sus receptores en el hipocampo participa en la codificación y la persistencia de la memoria episódica. Se ha demostrado que el LC envía la mayor cantidad de proyecciones catecolaminérgicas al hipocampo dorsal. Además, libera de manera conjunta DA y NE en respuesta a estímulos sensoriales novedosos y participa en la regulación del umbral de inducción de plasticidad sináptica. La lesión del LC afecta la consolidación de memoria espacial. Dentro de nuestro grupo de investigación se han obtenido resultados preliminares que muestran que la estimulación de las terminales del LC en el hipocampo dorsal provoca un aumento en las concentraciones extracelulares de DA y NE.

Dada la evidencia sobre la inducción de la plasticidad sináptica, particularmente la LTP en giro dentado del hipocampo por la estimulación optogenética de la vía LC-hipocampal, así como de la participación del sistema catecolaminérgico del LC dentro del hipocampo dorsal sobre la formación de la memoria espacial, surge el cuestionamiento de si la estimulación optogenética de LC induce una LTP en CA1 y del posible impacto del sistema catecolaminérgico del LC en el desempeño de otras tareas dependientes del hipocampo. Hasta el momento no existen trabajos que muestren una relación directa entre la LTP inducida por la estimulación de las fibras catecolaminérgicas provenientes del LC-CA1 y el desempeño de ratones en una tarea de memoria espacial. Por medio de técnicas optogenéticas, se puede realizar la estimulación selectiva de estas fibras para lograr la inducción de LTP y observar su efecto en la conducta de los animales durante la evaluación de la memoria espacial en el MWM y el BM. El establecimiento de la relación entre la plasticidad sináptica y la conducta nos permitirán tener una idea más clara de los mecanismos que subyacen al aprendizaje y la memoria, y que permiten el fortalecimiento de ciertos trazos de memoria junto con la mejora en el desempeño de los sujetos.

El presente trabajo se divide en dos partes.

PARTE 1

HIPÓTESIS

El aumento de la actividad catecolaminérgica en las terminales de CA1 permite la inducción de LTP en esta región del hipocampo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la estimulación optogenética de las terminales catecolaminérgicas en la vía del LC-CA1 permite la inducción de LTP.

PARTE 2

HIPÓTESIS

El aumento de la actividad catecolaminérgica en las terminales de CA1 mejora la persistencia de la memoria espacial.

OBJETIVO GENERAL 2

Establecer si la inducción de LTP por optogenética (oLTP) a través de la fotoestimulación de la vía LC-CA1 fortalece el trazo de memoria generado en protocolos de memoria espacial.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la estandarización del laberinto acuático de Morris y del laberinto de Barnes evaluando la memoria de largo plazo a los 1, 5 y 10 días después del entrenamiento.
- Explorar si la estimulación optogenética de las fibras catecolaminérgicas del LC-CA1 induce una oLTP en el hipocampo.
- Explorar si la fotoestimulación de la vía LC-CA1, inductora de oLTP, fortalece el trazo de memoria espacial evaluado por el MWM.
- Explorar si la fotoestimulación de la vía LC-CA1, inductora de oLTP, fortalece el trazo de memoria espacial evaluado por el BM.

III. METODOLOGÍA

1. Animales

Se utilizaron 22 animales (indistintamente machos y hembras) de la línea de ratones transgénicos B6. Cg-7630403G23RikTg (Th-Cre)1Tmd/J (TH-Cre) (<https://www.jax.org/strain/008601>) de entre 3-4 meses de edad y 18-22 g de peso, los cuales fueron genotipificados para confirmar la presencia del transgén (Rowan et al., 2017). Esta línea de ratones expresa a la proteína Cre recombinasa (Cre) bajo el promotor endógeno de la enzima TH y fueron amablemente donados por el Dr. Rui Costa del Champalimaud Center en Portugal. Igualmente, se utilizaron 30 animales silvestres (indistintamente machos y hembras) de la cepa C57BL/6J de entre 3-4 meses de edad y 18-22 g de peso para la estandarización de las tareas conductuales.

Cada animal se colocó en una caja individual en el *vivarium* del Instituto de Fisiología Celular (IFC) bajo un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, a 23°C, con alimento y agua *ad libitum*. La aplicación de las sesiones conductuales se realizó durante el periodo de luz de los animales. Los animales fueron asignados de manera aleatoria a cada grupo experimental.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en concordancia con el reglamento en materia de salud de la secretaría de salud de México sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM062-ZOO-1999) y con aprobación del comité de cuidado animal del IFC a cargo del bioterio que aprobó el protocolo (FBR128-18). Antes del inicio de los procedimientos conductuales se coloca a los animales en el cuarto de evaluación por al menos 30 minutos para que se aclimaten.

1.1 Genotipificación

Los animales transgénicos fueron genotipificados por el método HotSHOT reportado por nuestro grupo de investigación (Gil et al., 2020). Durante el procedimiento se obtiene una muestra de tejido de la punta de la cola de cada animal (alrededor de 1mm) y se lisa por medio de un agente alcalino (25mM NaOH, 0.2 mM EDTA disódico). Posteriormente se coloca en un baño de agua caliente a 95°C por 1 hora para lograr la extracción del ADN. A continuación, se agrega un buffer de neutralización (1M Tris-HCl, pH 7.4) y se centrifuga a 2500rpm durante 2 minutos. Por último, se recupera el sobrenadante que contiene el material genético y se almacena. Cada muestra es amplificada por medio de una PCR (201443, kit QIAGEN). Para este procedimiento, las secuencias de primer utilizadas fueron: Cre-forward 5'-AGC CTG TTT TGC ACG TTC ACC-3'; Cre-reverse 5'-GGT TTC CCG CAG AAC CTG AA-3' (Sigma-Aldrich, USA).

2. Cirugía estereotáxica

En el aparato estereotáxico, se realizó la infusión de 0.5 μ L por hemisferio de un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV) que sirve como vehículo para la transducción de material genético a poblaciones celulares específicas utilizando la maquinaria de infección del virus (Nicoll et al., 2017, Domjan et al., 2007). El vector contiene el gen de la proteína canal de rodopsina 2 acoplado a una proteína mensajera, rAAV5/Efl α -DIOhChR2(H134R)-eYFP (ChR2-eYFP) o únicamente la proteína reportera eYFP rAAV5/Efl α -DIO-eYFP (eYFP) para los ratones del grupo control.

Los virus con los vectores se obtuvieron de la Universidad de Carolina del Norte (UNC) Gene Therapy Center Vector Core, las concentraciones virales de 5.2×10^{12} moléculas ml⁻¹ para Chr2-eYFP y 6.0×10^{12} moléculas ml⁻¹ para el de eYFP. Los virus se almacenaron en alícuotas a -80°C. La infusión se realizó bilateralmente en el LC (desde Bregma (mm): AP -5.5, ML ± 0.9 y DV -3.3) de ratones anestesiados con isoflurano (inducción 3%, mantenimiento 1–1.5%, ViP 3000 Matrix) y se colocaron fibras ópticas (0.22 NA, 200 μ m de diámetro, Doric Lenses, Canada) en ambos hipocampos en la región de CA1 (desde Bregma (mm): AP -2.4, ML ± 2.0 y DV -1.0). El lugar la de infusión del virus y la colocación de las fibras ópticas se determinó utilizando las coordenadas dadas por el Allen Brain Atlas (Hahn et al., 2021). Después de la infusión, se dejó la punta del capilar en el sitio de inyección por 10 minutos antes de retirarla. Finalmente se colocaron férulas en el cráneo de los animales hechas de cemento adhesivo.

Después de las cirugías se dejó a los animales recuperarse por 21 días antes de continuar con los demás procedimientos experimentales.

3. Tareas conductuales

Una vez transcurrido el tiempo de recuperación, los animales se repartieron de manera aleatoria a los diferentes grupos experimentales y se inició el entrenamiento.

3.1 Laberinto acuático de Morris

Este laberinto consiste en una tina de 110 cm de diámetro y 50 cm de profundidad. La tina se llenó con agua y un poco de pintura blanca para opacarla. Se sumergió una plataforma cuadrada de 10 cm de lado de color blanco en uno de los cuadrantes de la tina. En las paredes de la tina se colocaron claves contextuales. El agua se mantuvo a 21°C. Se realizaron 4 días de entrenamiento con 4 sesiones cada día, en cada sesión se colocó al animal en una posición de inicio diferente (norte, centro, este u oeste, la plataforma se coloca en lo que sería el sur) (Bromley-Brits et al., 2011; McNamara y Skelton, 1993; Vorhees y Williams, 2006). Se dejó nadar a cada animal hasta encontrar la plataforma o por un tiempo máximo de dos minutos y se registró el tiempo que le toma llegar a la plataforma. Posteriormente, se dejó a los animales descansar por dos minutos después de cada ensayo. Terminados los entrenamientos se realizó la evaluación de la memoria a largo plazo. Durante la estandarización de la conducta se utilizaron ratones WT y se dividieron en grupos, cada grupo fue evaluado 1, 5 o 10 días después de la última sesión de entrenamiento. Por otro lado, para los experimentos con manipulaciones optogenéticas se determinó que la evaluación de la memoria de largo plazo de todos los grupos se realizaría 10 días después de la última sesión de entrenamiento.

3.2 Laberinto de Barnes

El laberinto se compone de una tabla con 20 agujeros formando un círculo de 100 cm de diámetro. De los 20 agujeros, 19 se encuentran cerrados y uno lleva a un compartimento oscuro debajo del laberinto. Se comenzó con un periodo de habituación donde se colocó a cada animal en el centro

del laberinto y se le fue guiando hacia el agujero objetivo. Posteriormente, durante la adquisición se metió a cada animal en una pequeña caja oscura para colocarlo en el centro del laberinto. Una vez iniciada la sesión se le dejó salir y explorar hasta localizar el agujero que lleva al compartimento oscuro. El periodo de adquisición fue de 4 días, cada día consistió en 3 sesiones en las que se tomó el tiempo que le tomó a cada ratón hacer un acercamiento al agujero objetivo (asomarse). Una vez que entraban al agujero se les permitía estar ahí por un minuto y se le regresaba a su caja. En cada sesión, los animales tenían un tiempo máximo de dos minutos para llegar al agujero objetivo, de lo contrario se les guiaba manualmente y con cuidado. Finalmente se realizaron las evaluaciones de la memoria a largo plazo. Durante la estandarización de la conducta se utilizaron ratones WT y se dividieron en grupos, cada grupo fue evaluado 1, 5 o 10 días después de la última sesión de entrenamiento. Por otro lado, para los experimentos con manipulaciones optogenéticas se determinó que la evaluación de la memoria de largo plazo de todos los grupos se realizaría 10 días después de la última sesión de entrenamiento.

4. Optogenética

4.1 Electrofisiología

Como se describe en los antecedentes de este proyecto, se ha establecido la inducción de LTP por optogenética (oLTP) en la vía LC-CA1 a través del registro de las respuestas corticales evocadas por la foto estimulación de las colaterales de Shaffer.

Al grupo de ratones para la electrofisiología se les infectó con ChR2-eYFP o eYFP (como se describe en la sección de cirugía estereotáxica), se les anestesió con una inyección intraperitoneal de pentobarbital de sodio (60 mg/kg) y se les colocó en el aparato estereotáxico. Para la estimulación eléctrica y registros, se implantaron 4 electrodos de cable de acero inoxidable (0.1mm de diámetro recubiertos con teflón, Biomedical Instruments, Germany) en cada animal (Fig. 5). Uno es un electrodo monopolar de registro que se colocó en el hipocampo en CA1 (desde Bregma (mm): AP - 2.2, ML -1.4 y DV de -1.0 a -1.5), otro es un electrodo bipolar de estimulación que se coloca en el hipocampo CA3 (desde Bregma (mm): AP -1.5, ML +2.0 y DV de -1.0 a -1.5) y los últimos dos son el de referencia y el de tierra que se colocan en la corteza (AP 0.0 mm, ML -1.5 mm y DV 0.0mm).

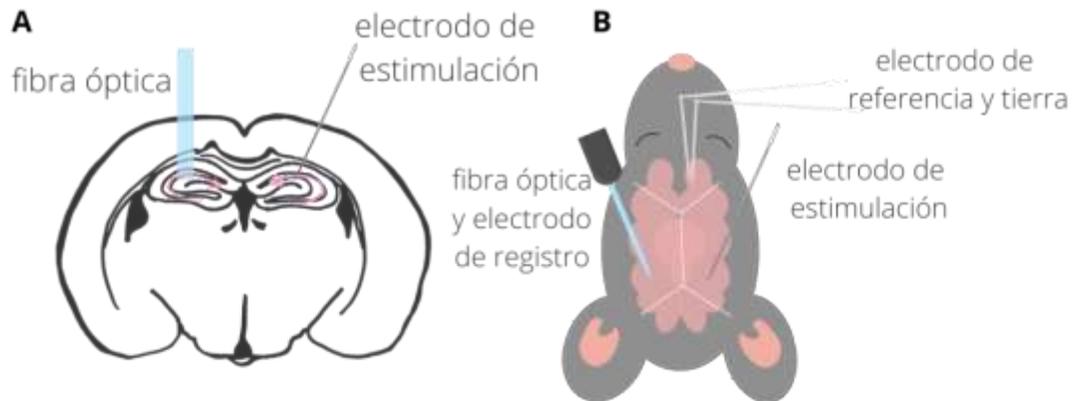


Figura 6. Colocación de electrodos para registros electrofisiológicos. A. Vista lateral de la colocación de la fibra óptica (azul) y el electrodo de estimulación en el hipocampo dorsal. B. Esquema de la implantación de fibra óptica y electrodo de registro en CA1 (azul) Del lado contralateral se colocó el electrodo de estimulación. En la parte anterior del cráneo se colocaron los electrodos de referencia y tierra.

Para medir la actividad sináptica en CA1 se analizó la pendiente del curso temporal de los potenciales de campo postsinápticos excitadores (fEPSP). Las respuestas basales se evocaron a través de la estimulación a 0.25 Hz con pulsos de ondas cuadradas bifásicas de 0.25 ms cada media onda. Se probaron diferentes intensidades de estimulación para identificar la pendiente máxima de los fEPSP. Para obtener una línea basal estable se registraron los potenciales basales (aquellos que evocan el 50% de la pendiente máxima de los fEPSP) por 15 min (pendiente fEPSP $\pm 10\%$).

Los parámetros empleados para la inducción de oLTP fueron trenes de pulsos de luz de 20Hz o 1 Hz a 473nm, uno cada cinco segundos, durante 10 min en animales anestesiados. Se registró una línea base de 16 minutos previa a la estimulación y posteriormente se continuó el registro durante 60 minutos después de la fotoestimulación. Se analizó la pendiente de los fEPSP de la respuesta neuronal evocada por la estimulación a cada una de las frecuencias.

4.2 Inducción de oLTP y conducta

Se ha establecido que la LTP en las neuronas piramidales de CA1 puede ser inducida a través de la estimulación de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer. Esta estimulación se puede lograr por medio de métodos electrofisiológicos, logrando la inducción de una LTP con pulsos de 100 Hz. Sin embargo, esta frecuencia de estimulación se sale de las frecuencias de disparo típicas de las neuronas por lo que se considera demasiado artificial. Además, la estimulación eléctrica no permite la activación selectiva de un determinado tipo celular. Dado que se logró obtener la inducción de oLTP por la fotoestimulación de alta frecuencia (20 Hz) de la vía de interés utilizamos este protocolo en los grupos experimentales. Terminando cada día de entrenamiento en alguno de los laberintos se aplicó el protocolo de inducción de oLTP (pulsos de luz a 473nm, 20Hz, 5s ON/OFF, 10 min) a cada

ratón. Finalizados los entrenamientos se realizó la evaluación de la memoria de largo plazo a los 10 días.

5. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). Para el análisis estadístico se empleó una prueba t-Student no pareada de 2 colas para comparar entre 2 grupos y una ANOVA de una vía para ver las diferencias entre más de 2 grupos junto con un test post hoc para múltiples comparaciones. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism (versión 7, USA).

IV. RESULTADOS

1. Protocolo de inducción de oLTP

La inducción de LTP en el hipocampo dorsal a través de la estimulación de las terminales catecolaminérgicas del LC-CA1 se puede lograr por medio de la estimulación eléctrica de alta frecuencia (100 Hz) de esta vía. Sin embargo, esta estimulación no permite el control selectivo de las terminales que se activan. Por esta razón se han desarrollado técnicas de la inducción de oLTP que permiten la activación específica de las neuronas catecolaminérgicas del LC-CA1 y el mejoramiento de la transmisión sináptica utilizando frecuencias de estimulación dentro del rango biológico. Dentro de nuestro grupo de investigación se han utilizado ratones transgénicos TH-Cre con la infusión de un vector viral Chr2-eYFP para determinar la frecuencia de estimulación optogenética de las terminales del LC en CA1 que permite la inducción de oLTP (Fig. 7 A y B). De esta forma se diseñó el protocolo de inducción de oLTP. Para el establecimiento del protocolo se probaron frecuencias de estimulación de 1 y 20 Hz y se registró la amplitud de la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios de campo en función del tiempo. La estimulación se realizó después del registro de una línea base y se continuó hasta 80 minutos (Fig. 7 C).

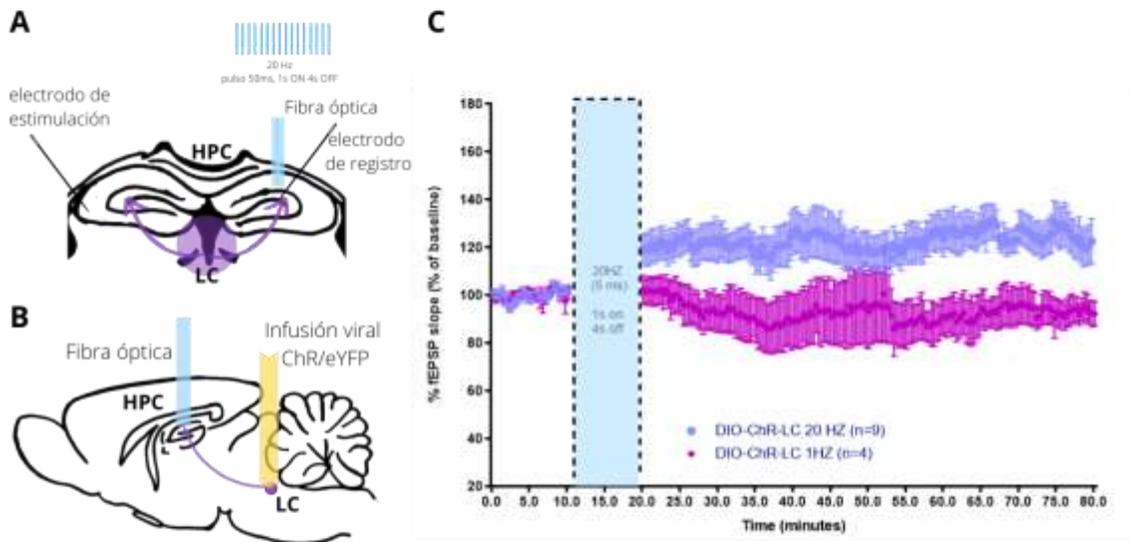


Figura 7. Protocolo de inducción de oLTP. A. Corte coronal del cerebro que muestra la implantación de la fibra óptica y los electrodos de estimulación y registro en CA3 y CA1. B. Vista lateral de la vía LC-CA1 (morado) donde se muestra la infusión viral en el LC (amarillo) y la colocación de la fibra óptica (azul). C. Curso temporal del porcentaje de la amplitud de los fEPSP registrados por 80 min. Después de registrar valores basales, se aplica el protocolo de inducción de oLTP por 10 minutos a 1 Hz (violeta) o 20 Hz (azul). El protocolo consiste en pulsos de luz a 473nm, 5s ON/5s OFF en cada una de las frecuencias especificadas.

2. Caracterización de las tareas de memoria espacial

La habilidad de aprender la localización especial de un objeto o de uno mismo es esencial para la supervivencia de un organismo (Bear et al., 2020). Durante la adquisición de la memoria espacial se utilizan claves externas que permiten la orientación y la codificación del aprendizaje. El hipocampo se encarga de la codificación y almacenamiento de la memoria espacial a través de la activación de

mecanismos de plasticidad sináptica que permiten que el animal determine su posición relativa (Moser et al., 2008). Para establecer el desempeño de los animales en cada una de las tareas conductuales elegidas realizamos la estandarización de los laberintos. En esta parte del proyecto se utilizaron animales de la cepa C57BL/6J (WT) y se dividieron en 3 grupos de manera aleatoria. Uno de ellos fue evaluado a las 24 horas después de concluir el entrenamiento, el siguiente grupo a los 5 días y el tercer grupo a los 10 días.

Para la estandarización del WMW (Fig.8 A) se entrenó a los animales durante 4 días, 4 sesiones cada día. Posteriormente se realizó la sesión de evaluación de la MLP (1, 5 y 10 días). Durante el entrenamiento se registró el tiempo de latencia de cada sesión y se promedió para cada día (Fig. 8 B). De esta manera se puede observar que conforme pasan los días de entrenamiento la latencia a la plataforma va disminuyendo. Esto es considerado una representación del aprendizaje adquirido por los animales. A continuación, la evaluación de la MLP se realizó para cada uno de los grupos, en esta sesión se retira la plataforma. Visualmente se puede observar que los ratones evaluados a las 24 horas pasan la mayor parte del tiempo en la zona donde se encontraba la plataforma, pasando muy poco tiempo en los otros cuadrantes (Fig.8 C, círculo verde), mientras que los evaluados a los 5 días tienen un comportamiento intermedio y los evaluados a los 10 días nadan por todo el laberinto de manera aleatoria (Fig.8 C, círculo rosa y naranja). Al realizar los análisis detallados de los cruces (Fig. 8 D), latencia (Fig. 8 E), y porcentaje de tiempo en el cuadrante objetivo (Fig. 8 F) se pueden ver las diferencias entre los grupos. En el número de cruces con la zona donde se encontraba la plataforma observamos que conforme aumenta el periodo entre el entrenamiento y la evaluación, el valor disminuye (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 3.430$, $p < 0.05$; Tukey 1 día VS 10 días $p = 0.0453$:) (Fig. 8 D). Por otro lado, la latencia de llegada a la zona donde estaba la plataforma aumenta conforme aumenta el periodo de retención de la MLP (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 3.185$, $p < 0.05$; Tukey 1 día VS 10 días $p = 0.0473$:) (Fig. 8 E). En cuanto al porcentaje de tiempo de nado en el cuadrante objetivo no se observa una diferencia de comportamiento clara entre los grupos (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 0.9609$, $p = 0.3957$) (Fig. 8 F). Esto puede deberse a que la tarea exige que los ratones naden continuamente para no ahogarse por lo que no suelen permanecer demasiado tiempo en el cuadrante al hacer un cruce. Así, el realizar una gran cantidad de cruces no implica permanecer un mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante. En protocolos con un mayor número de animales, la variabilidad en este parámetro disminuye ($n > 20$ animales) (Kapadia et al., 2016). Finalmente, se analiza la velocidad promedio de nado de los animales para asegurar que todos tienen la misma capacidad de nado y motivación para salir del agua. En este parámetro no se encontraron diferencias entre los grupos (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 0.8574$, $p = 0.4359$) (Fig. 8 G).

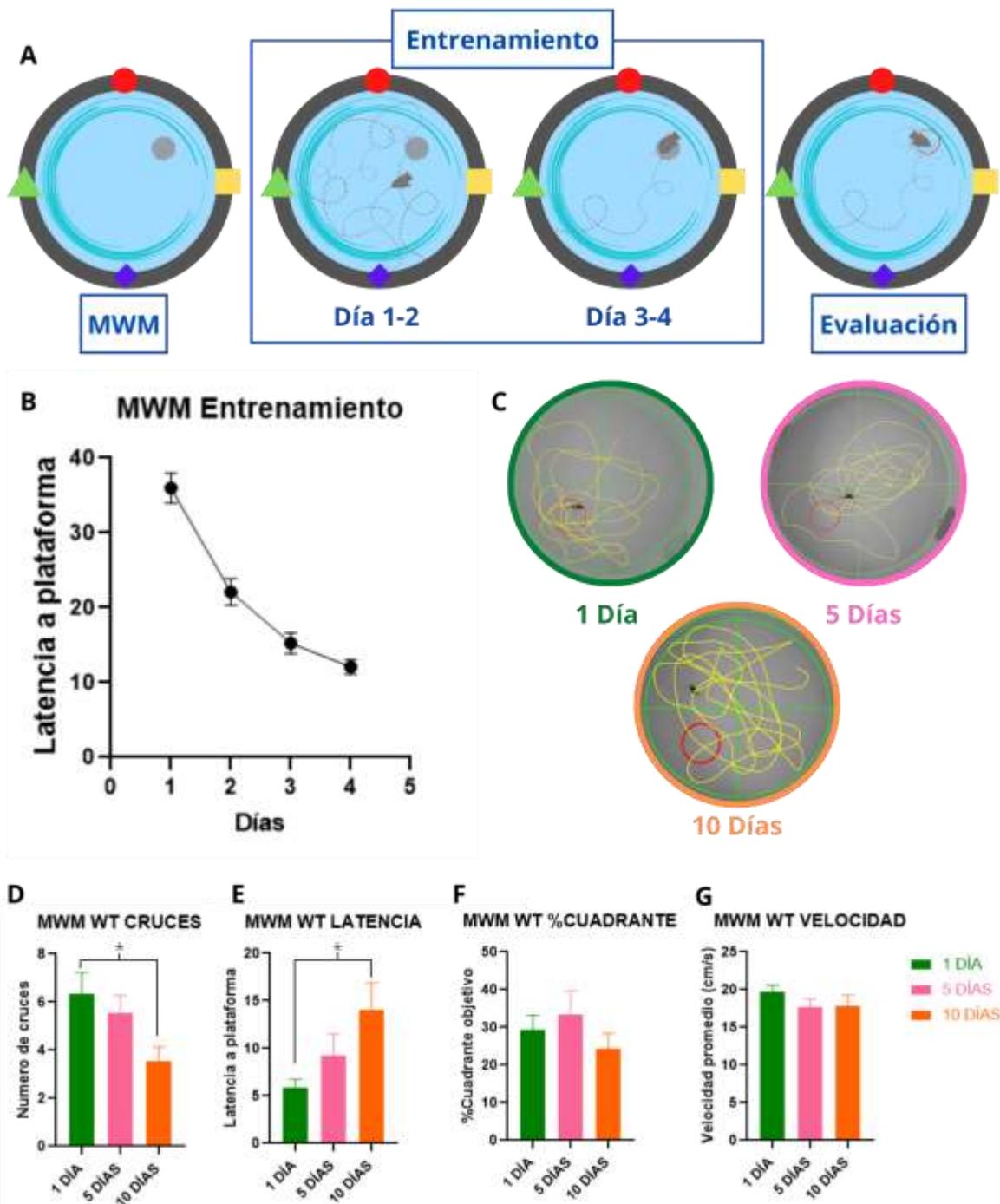


Figura 8. Estandarización MWM. A. Esquema del protocolo conductual. B. Latencia a la plataforma en los entrenamientos. C. Análisis de la tarea en ImajeJ, imagen representativa para cada grupo (1 día verde, 5 días rosa y 10 días naranja). Los cuadrantes del laberinto se separan por líneas verdes y la trayectoria de nado se marca con líneas amarillas. D-G. Numero de cruces, latencia, porcentaje de tiempo en el cuadrante objetivo y velocidad promedio durante la sesión de evaluación para cada grupo, respectivamente. 1 día (verde, n= 9), 5 días (rosa, n=11) y 10 días (naranja, n=8). Todos los resultados muestran la media \pm sem. * $p < 0.05$.

De igual manera, para la estandarización del BM (Fig.9) se realizaron 4 días de entrenamiento de 3 sesiones cada día. Posteriormente se realizó una sesión de evaluación de la MLP (Fig. 9 A) en diferentes temporalidades (1, 5 y 10 días).

Durante el entrenamiento se registró el tiempo de latencia al agujero de cada sesión y se promedió para cada día (Fig. 9 B). Al igual que el MWM, conforme pasan los días de entrenamiento la latencia al objetivo va disminuyendo, representando así el aprendizaje adquirido. En la evaluación se cubrió el agujero objetivo y se registraron los índices de aprendizaje. Visualmente se puede observar que los ratones evaluados a las 24 horas pasan la mayor parte del tiempo en la zona del agujero objetivo y muy poco tiempo en los otros cuadrantes (Fig. 9 C, círculo verde), mientras que los de 5 días tienen un comportamiento intermedio y los de 10 días recorren todo el laberinto indistintamente (Fig. 9 C, círculo rosa y naranja). En cuanto al número de cruces con el agujero, observamos que hay una diferencia significativa entre los grupos de 1 día y 10 días (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 4.684$, $p < 0.05$; Tukey 1 día VS 10 días $p = 0.015$) (Fig. 9 D), por lo que la memoria a los 10 días no se recupera fácilmente. Por otro lado, la latencia de llegada al agujero aumenta conforme aumenta el periodo de retención de la MLP (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 3.15$, $p < 0.05$; Tukey 1 día VS 10 días $p = 0.0494$) (Fig. 9 E). El porcentaje de tiempo que pasan los animales en el cuadrante objetivo también es significativamente diferente entre los grupos de 1 y 5 días (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 3.344$, $p < 0.05$; Tukey 1 día VS 5 días $p = 0.0417$) (Fig. 9 F). Finalmente, también se analiza la velocidad promedio de los animales para asegurar que no existen déficits en el movimiento y no se registran diferencias significativas entre los grupos (one way ANOVA: $F_{(2,26)} = 0.3180$, $p = 0.7304$) (Fig. 9 G).

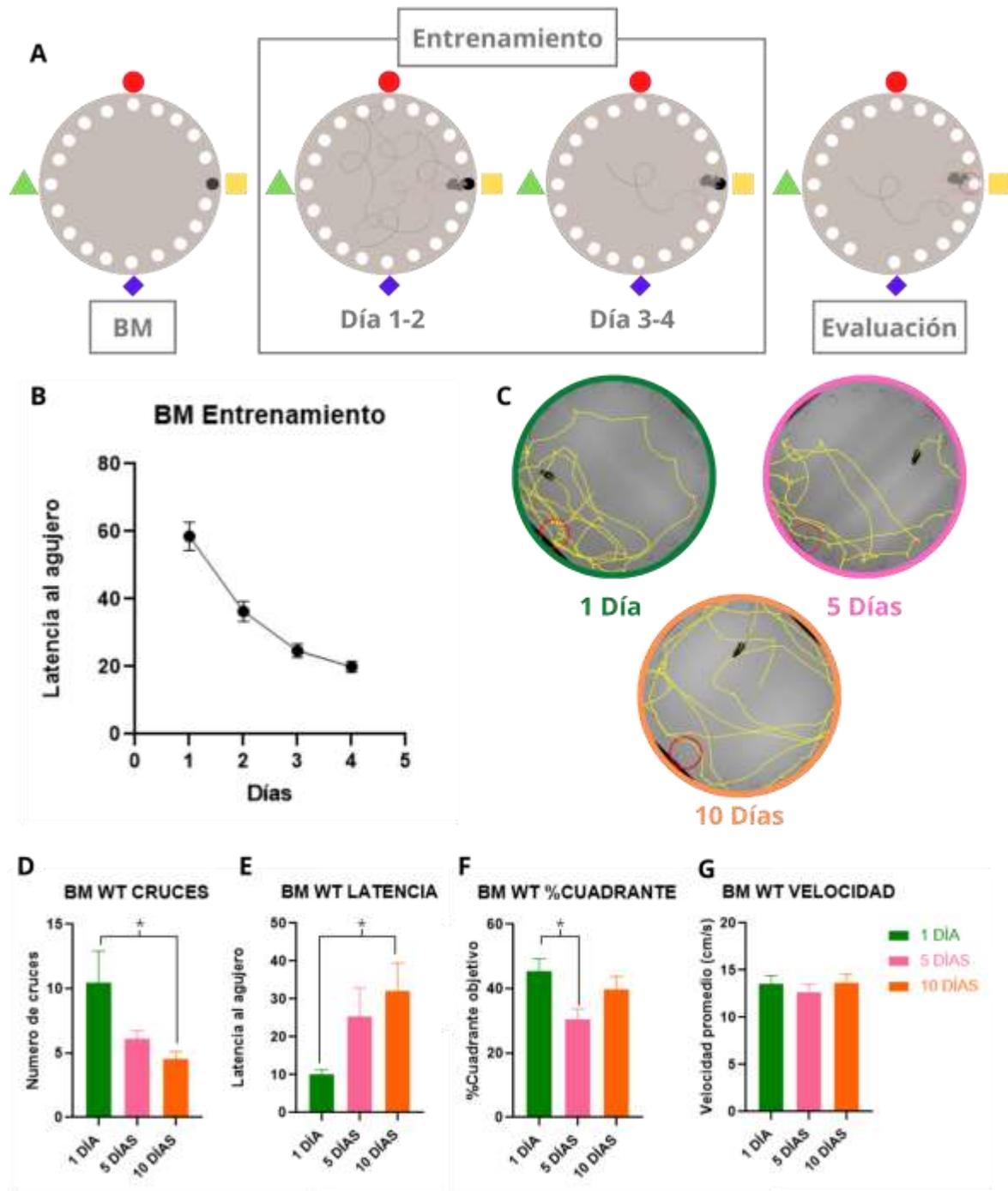


Figura 9. Estandarización BM. A. Esquema del protocolo conductual. B. Latencia al agujero en los entrenamientos. C. Análisis de la tarea en ImajeJ, imagen representativa para cada grupo (1 día, verde; 5 días, rosa; 10 días, naranja). Los cuadrantes del laberinto se separan por líneas verdes y la trayectoria de los animales se marca con líneas amarillas. D-G. Numero de cruces, latencia, porcentaje de tiempo en el cuadrante objetivo y velocidad promedio en sesión de evaluación para cada grupo, respectivamente. 1 día (verde, n=9), 5 días (rosa, n=8) y 10 días (naranja, n=12). Todos los resultados muestran la media \pm sem. * $p < 0.05$.

3. La expresión de oLTP por la estimulación de la vía LC-CA1 aumenta la persistencia de la memoria.

Las catecolaminas tienen un efecto modulador sobre los procesos de plasticidad sináptica en el hipocampo. La liberación de DA y NE desde el LC-CA1 es capaz de regular la transcripción de proteínas necesarias para la plasticidad, además de participar en los procesos de consolidación y persistencia de la memoria espacial. Para establecer el efecto que tiene la LTP inducida por la estimulación de las fibras catecolaminérgicas provenientes del LC-CA1 en el desempeño de ratones en MWM y BM, utilizamos ratones transgénicos TH-Cre a los que se les realizó la infusión de un vector viral ChR2-eYFP o eYFP (grupo control) en el LC (Fig.10 A, B y C). Después de 21 días se inició con protocolos para ambos laberintos (Fig. 10 D). Se realizaron 4 días de entrenamiento. Al finalizar las sesiones de cada día se realizó el protocolo de inducción de oLTP. Una vez concluidos los entrenamientos se evaluó la MLP a los 10 días en cada tarea.

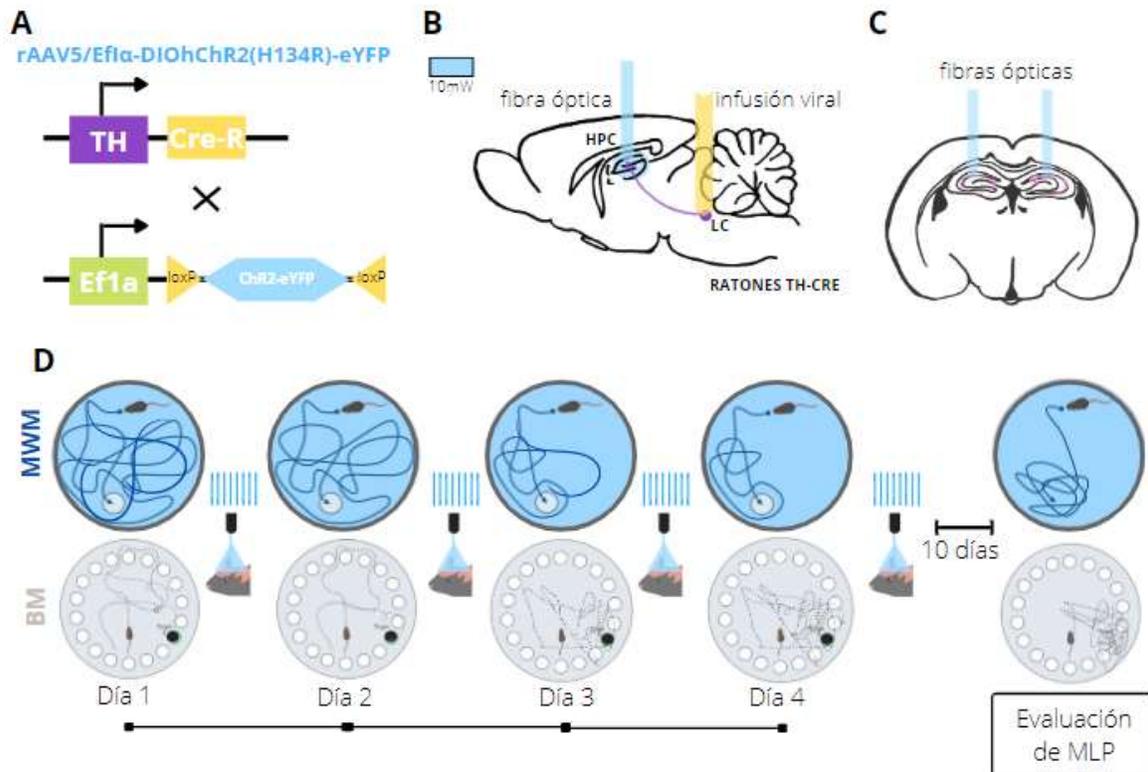


Figura 10. Metodología general. A. Se inyectaron vectores virales Cre-inducibles en ratones TH-Cre. B. Esquema lateral de la infusión viral de ChR2 o el control eYFP en el LC (amarillo) e implantación de las fibras ópticas en el hipocampo dorsal CA1 (azul), la vía de interés es del LC-CA1 (morado). C. Esquema coronal de la localización de las fibras ópticas (azul) en el hipocampo dorsal CA1. D. Protocolos conductuales de MWM (arriba, azul) y BM (abajo, gris), entrenamiento por 4 días y evaluación de la MLP a los diez días.

3.1 La inducción de oLTP aumenta la persistencia de la memoria en MWM.

El protocolo de inducción de oLTP se da después de cada día de entrenamiento (Fig. 11 A). Durante el entrenamiento, se registra el tiempo de latencia de cada sesión y se promedia para cada día. En esta sección se observa que conforme pasan los días de entrenamiento la latencia a la plataforma va disminuyendo (Fig. 11 B). A pesar de que no se registra una diferencia entre los grupos (two way ANOVA: $F_{(2,37)} = 20.59$, $p(\text{día1}) = 0.8852$, $p(\text{día2}) = 0.3721$, $p(\text{día3}) = 0.3721$, $p(\text{día4}) = 0.2077$), se puede ver una tendencia durante el día 2 y 3 del entrenamiento (Fig. 11 B). En el cuarto día se llega a un efecto de techo lo cual nos indica que todos los animales de ambos grupos adquirieron el aprendizaje al finalizar los entrenamientos. En la evaluación de la MLP se puede observar que los ratones del grupo ChR2-eYFP nadan la mayor parte del tiempo por la zona donde se encontraba la plataforma, pasando muy poco tiempo en los otros cuadrantes (Fig. 11 C, círculo azul), mientras que los del grupo control (eYFP) nadan por todo el laberinto casi sin cruzar el área de la plataforma (Fig. 11 C, círculo gris). En el análisis del número de cruces con la zona donde estaba la plataforma, observamos que el grupo ChR2-eYFP tiene un mayor número de cruces que el grupo control (t-student two tails unpaired: $t_{(18)} = 4.785$, $p = 0.0001$) (Fig. 11 D). Por otro lado, la latencia de llegada a la zona donde estaba la plataforma es menor en el grupo ChR2-eYFP (t-student two tails unpaired: $t_{(18)} = 3.097$, $p = 0.0062$) (Fig. 11 E). En cuanto al porcentaje de tiempo de nado en el cuadrante objetivo se observa una diferencia de comportamiento entre los dos grupos (t-student two tails unpaired: $t_{(18)} = 2.114$, $p = 0.0487$) (Fig. 11 F). Esto nos demuestra que existen diferencias entre el grupo con la inducción de oLTP y el control. Finalmente, se analiza la velocidad promedio de nado de los animales para asegurar que no existen déficits motores y no se registran diferencias entre los grupos (t-student two tails unpaired: $t_{(18)} = 1.536$, $p = 0.1420$) (Fig. 11 G).

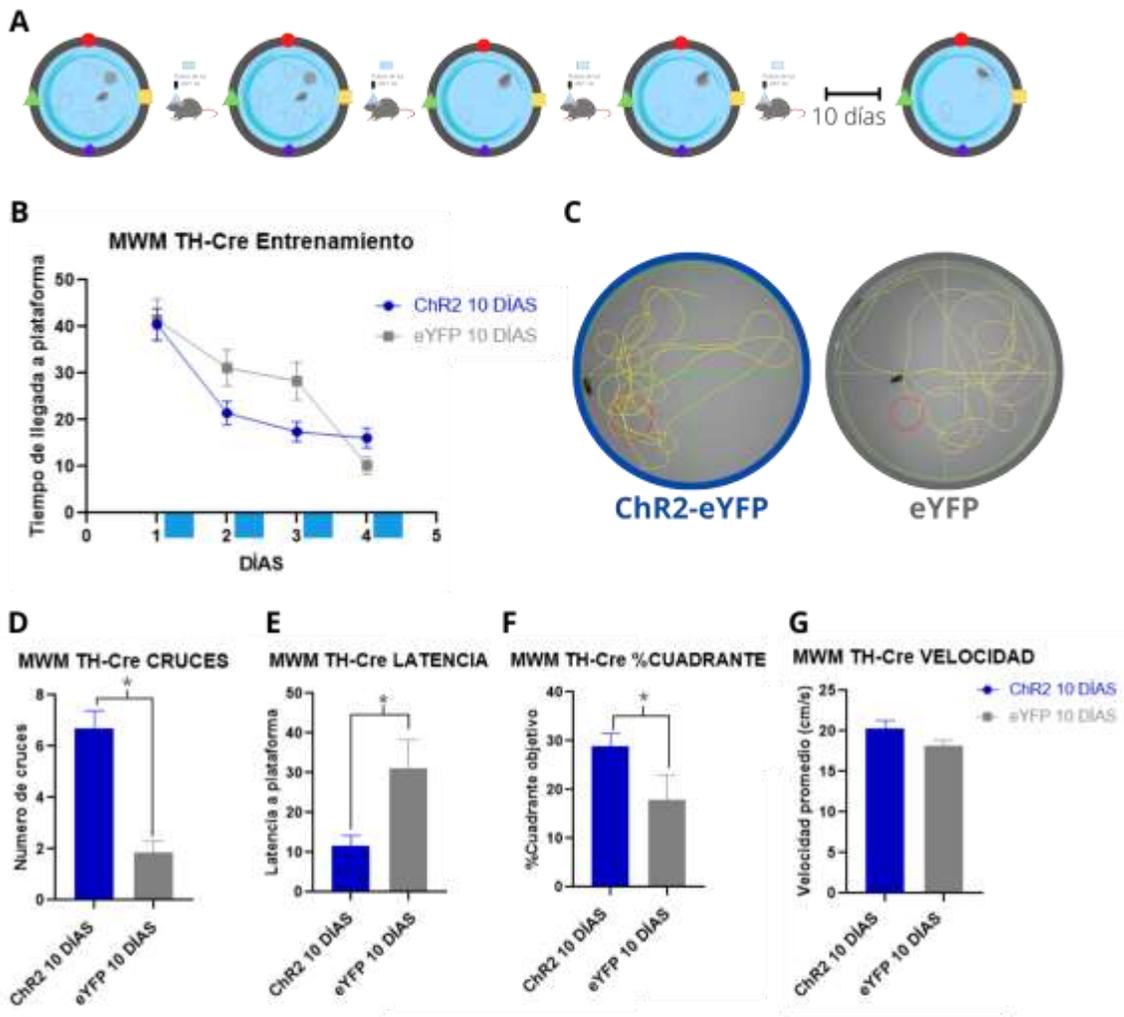


Figura 11. La inducción de oLTP en la vía de LC-CA1 aumenta la persistencia de la memoria en MWM. A. Esquema del protocolo conductual con la estimulación optogenética. B. Latencia a la plataforma en los entrenamientos para el grupo de ratones ChR2-eYFP (azul, n=13) y el grupo eYFP (gris, n= 7). C. Análisis de la tarea en ImajeJ, imagen representativa para cada grupo (ChR2-eYFP, azul; eYFP, gris). Los cuadrantes del laberinto se separan por líneas verdes y la trayectoria de nado se marca con líneas amarillas. D-G. Numero de cruces, latencia, porcentaje de tiempo en el cuadrante objetivo y velocidad promedio en sesión de evaluación para cada grupo, respectivamente. ChR2-eYFP (azul, n= 13), eYFP (gris, n=7). Todos los resultados muestran la media \pm sem. * $p < 0.05$.

3.2 La inducción de oLTP aumenta la persistencia de la memoria en BM.

De igual manera, se aplicó el protocolo de inducción de oLTP después de cada día de entrenamiento (Fig. 12 A). Se toma el tiempo de latencia de cada sesión y promedia por día. Observamos que la latencia al agujero disminuye con cada día de entrenamiento. En este caso, no observamos una tendencia clara entre los grupos en cada día de entrenamiento (two way ANOVA: $F_{(2,4,48.1)} = 17.28$, $p(\text{día1}) = 0.8874$, $p(\text{día2}) = 0.8426$, $p(\text{día3}) = 0.8874$, $p(\text{día4}) = 0.8874$) (Fig. 12 B). No obstante, igualmente demostramos que todos los animales adquieren el aprendizaje dentro del periodo de

entrenamiento. Durante la evaluación de la MLP el grupo ChR2-eYFP permanece principalmente en la zona del agujero (Fig. 12 C, círculo azul), pero no los del grupo control (eYFP) (Fig. 12 C, círculo gris). Esta es una muestra del aprendizaje adquirido. El grupo ChR2-eYFP realiza un número de cruces significativamente mayor con el agujero que el grupo eYFP (t-student two tails unpaired: $t_{(20)} = 4.121$, $p = 0.0005$) (Fig. 12 D). Asimismo, el grupo ChR2-eYFP muestra una menor latencia en comparación al grupo eYFP (t-student two tails unpaired: $t_{(20)} = 2.089$, $p = 0.0497$) (Fig. 12 E) y un porcentaje de tiempo en el cuadrante objetivo significativamente mayor en comparación con el control (t-student two tails unpaired: $t_{(20)} = 2.092$, $p = 0.0494$) (Fig. 12 F). La velocidad promedio de los animales es similar para ambos grupos (t-student two tails unpaired: $t_{(20)} = 1.421$, $p = 0.1708$) (Fig. 11 G) por lo que no existen déficits motores.

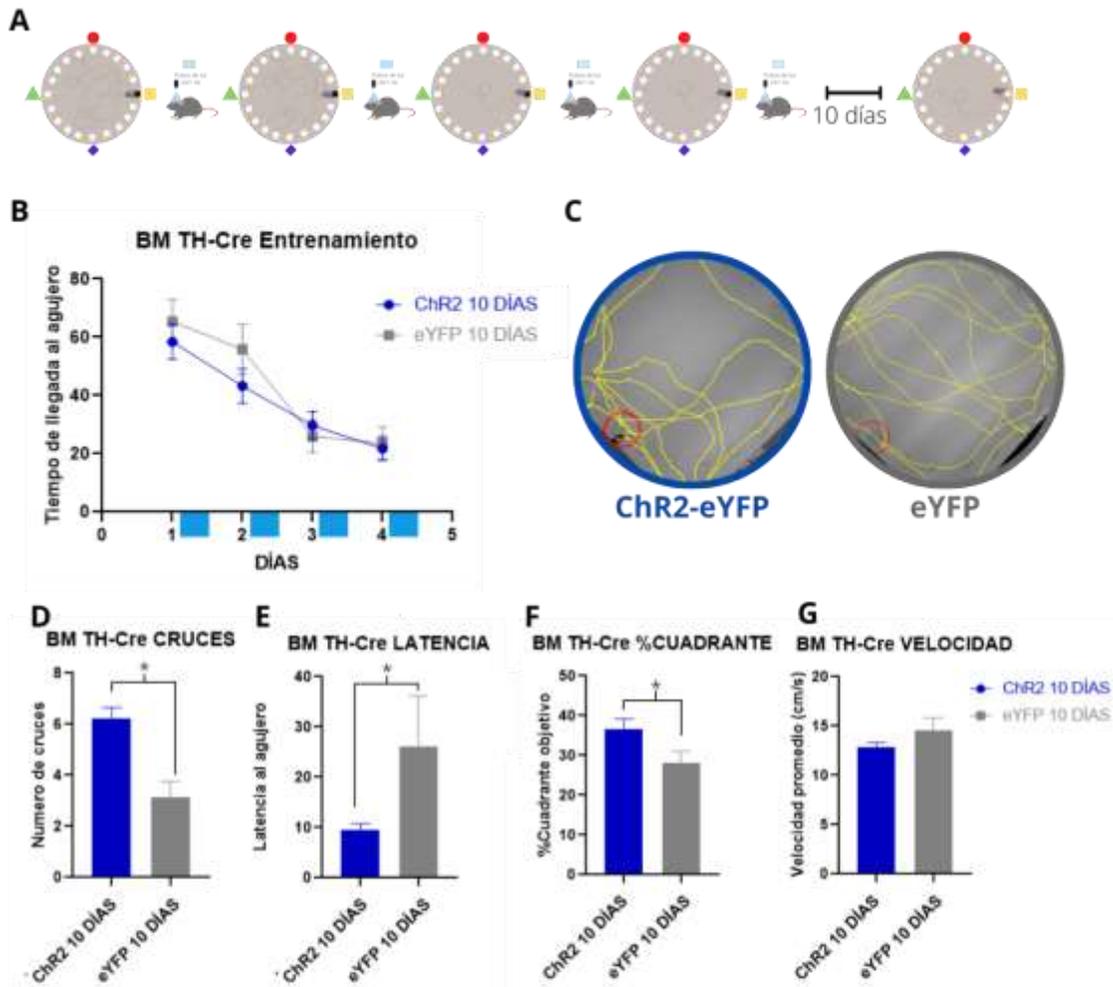


Figura 12. La inducción de oLTP en la vía de LC-CA1 aumenta la persistencia de la memoria en BM. A. Esquema del protocolo conductual con la estimulación optogenética. B. Latencia al agujero en los entrenamientos para el grupo de ratones ChR2-eYFP (azul, n=14) y el grupo eYFP (gris, n= 8). C. Análisis de la tarea en ImajeJ, imagen representativa para cada grupo (ChR2-eYFP, azul; eYFP, gris). Los cuadrantes del laberinto se separan por líneas verdes y la trayectoria de cada animal se marca con líneas amarillas. D-G. Numero de cruces, latencia, porcentaje de tiempo en el cuadrante objetivo y velocidad promedio en sesión de evaluación para cada grupo, respectivamente. ChR2-eYFP (azul, n= 14), eYFP (gris, n=8). Todos los resultados muestran la media \pm sem. * $p < 0.05$.

V. DISCUSIÓN

En la presente tesis encontramos que la estimulación de optogenética de alta frecuencia de la vía LC-CA1 induce una potenciación a largo plazo (oLTP) en el hipocampo. El establecimiento del protocolo de inducción de oLTP en la vía del LC-CA1 produjo un aumento de la pendiente de los fPSEP que se mantiene hasta 80 minutos (Fig. 8). Este trabajo representa la primera evidencia directa de una LTP en CA1 inducida a través de la fotoestimulación de las terminales catecolaminérgicas de la vía LC-CA1.

Caracterizamos las tareas de memoria espacial que se exploran en el MWM y en el BM. Encontramos que el trazo de memoria generado después del aprendizaje de estas dos tareas espaciales es fácilmente recuperado a las 24 horas (Fig. 7 y 8 D-F). Sin embargo, diez días después de haber concluido el entrenamiento la recuperación de la información sobre la localización espacial de la plataforma (para MWM) o del agujero objetivo (para BM) se dificulta. Esto resulta en un mal desempeño de los animales en la evaluación de la MLP (Fig. 7 y 8 D-F).

Por último, demostramos que la inducción de oLTP en la vía LC-CA1 aumenta la persistencia de la memoria, probada en ambos laberintos. Una vez establecido el protocolo de inducción de oLTP (Fig. 9) en la vía LC-CA1 entrenamos a los animales en la tarea de MWM y BM. A estos animales se les aplicó dicho protocolo después de cada día de entrenamiento (Fig. 10). Posteriormente realizamos una prueba de MLP a los 10 días y encontramos que la inducción de la oLTP recuperaba el trazo de memoria. Los resultados obtenidos sugieren que la administración del protocolo de inducción de oLTP logra mejorar el desempeño de los animales en las dos tareas de memoria espacial.

La posibilidad de describir ciertos aspectos sobre el aprendizaje a través de la estimulación de la liberación de catecolaminas en una región específica permite evaluar su papel en la señalización de la configuración espacial y la formación de la memoria. La relación entre los mecanismos de plasticidad sináptica involucrados en la consolidación de trazos de memoria espacial en el hipocampo y el desempeño de animales en una tarea conductual aún no se establecen por completo. El posible papel de las catecolaminas en la inducción de LTP y la consolidación de la memoria se puede estudiar utilizando paradigmas conductuales que evalúen el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo como el MWM y el BM. Al asociar las claves contextuales en los laberintos con la localización de un objetivo, ya sea la plataforma o el agujero, se genera un engrama que se utiliza para guiar la conducta de los animales durante la evaluación de la MLP.

Existen pocos estudios sobre el papel de las catecolaminas en la consolidación de la memoria espacial dependiente del hipocampo. Dado que la mayor inervación catecolaminérgica al hipocampo dorsal proviene del LC (Takeuchi et al., 2016; Kempadoo et al., 2016; Gálvez et al., 2022) se propone que esta región participa en la integración de información sobre la configuración espacial. La depleción catecolaminérgica al hipocampo dorsal evita la formación de la memoria espacial en OLM (Moreno-Castilla et al., 2017). Además, la inactivación funcional del LC dificulta la formación de la memoria y evita la inducción de una LTP persistente en el hipocampo (Zornetzer y Gold, 1976; Huang y Kandel, 1995).

Actualmente han surgido herramientas que nos ayudan a estudiar de manera precisa lo que sucede en el cerebro durante la adquisición, consolidación y evocación de la memoria. Una de las herramientas más útiles en las neurociencias es la optogenética. Esta técnica nos permite controlar

la actividad neuronal *in vivo* con una alta resolución temporal, facilitando el estudio de los mecanismos de plasticidad sináptica. La implementación de una metodología que permite mejorar la resolución espacial y el rango de frecuencias de estimulación utilizadas es importante para el análisis de la actividad neuronal en tiempo real de forma menos invasiva y más fisiológica. Otra ventaja del método es que se puede analizar simultáneamente la inducción de LTP y la conducta al estimular una vía en específico, en este caso la vía del LC-CA1. Esto nos permite ver la respuesta de la liberación de DA y NE durante la consolidación de la memoria.

Si bien hay evidencias que muestran la participación directa de la DA y NE en los mecanismos de aprendizaje y memoria (Takeuchi et al., 2016; Kempadoo et al., 2016), así como el hecho de que la estimulación optogenética del LC es capaz de inducir una LTP débil en el giro dentado (Quinlan et al., 2019), hasta ahora no se ha elucidado cuál es la relación entre la LTP inducida por estimulación de la vía del LC-CA1 y la conducta. De tal manera que el presente trabajo aporta una evidencia directa de esta relación al utilizar técnicas como la optogenética para guiar la inducción de plasticidad sináptica de manera controlada.

Dentro del hipocampo se ha visto que existe una correlación entre la codificación de la configuración espacial y la liberación de catecolaminas (Moreno-Castilla et al., 2018). Se propone, a partir de los resultados obtenidos del establecimiento del protocolo de inducción de oLTP en la vía del LC-CA1 que el aumento de la liberación de DA y NE lleva a la activación de los mecanismos de plasticidad y mejora la comunicación celular. Asimismo, se sugiere que la administración del protocolo de inducción de oLTP logra mejorar el desempeño de los animales en las dos tareas de memoria espacial. La aplicación del protocolo de inducción de oLTP al final de cada día de entrenamiento fortaleció el trazo de memoria que se estaba consolidando (Fig. 11 y 12). Esto demuestra que este tipo de oLTP en el hipocampo, producida posiblemente por la liberación de DA y NE contribuye al fortalecimiento del trazo de memoria para el MWM y BM. Los resultados concuerdan con evidencias previas en donde se reporta una mejora en la memoria espacial después de la estimulación del LC (Kempadoo et al., 2016, Takeuchi et al., 2016), estableciendo una relación directa entre la LTP inducida por estimulación de las fibras catecolaminérgicas del LC-CA1 y el desempeño de los animales en el MWM y el BM. En concreto la oLTP aumenta la persistencia de la memoria espacial adquirida durante el aprendizaje y permite que los animales recuperen la información durante la prueba de la memoria a los 10 días.

Es posible que la respuesta observada se deba a la activación de los receptores dopaminérgicos y noradrenérgicos en las células postsinápticas lo que refleja una respuesta dependiente de la experiencia. Incluso, nuestro grupo de investigación ha obtenido resultados preliminares que muestran un aumento de las concentraciones de DA y NE durante la inducción de oLTP. Por lo tanto, la actividad catecolaminérgica forma parte del mecanismo que permite consolidar la memoria espacial en las tareas de MWM y BM. Después de todo, tanto la DA como la NE han sido implicadas en el procesamiento y la consolidación de la memoria espacial en modelos como el de OLM (Moreno-Castilla et al., 2018).

Un posible mecanismo molecular que explica los cambios en la persistencia de la memoria es el que se enfoca en los diferentes tipos de receptores y las cascadas de señalización asociados a su activación. Sabemos que el aprendizaje de tareas como el MWM y el BM genera cambios en la actividad de las neuronas hipocampales desencadenando la síntesis de proteínas necesarias para la

plasticidad sináptica (Redish y Touretzky 1998; McNamara y Skelton, 1993; Patil et al., 2009; Sadeghian et al., 2019). La información sobre la configuración espacial del ambiente es codificada por las células de lugar y utilizada para guiar la conducta de los animales. La unión de glutamato a sus receptores, AMPA y NMDA, en las células postsinápticas del hipocampo dorsal permite la entrada de cationes como sodio y calcio importantes para la transmisión sináptica. El bloqueo de los receptores glutamatérgicos en el hipocampo evita la formación de la memoria espacial y genera un déficit en los mecanismos de plasticidad sináptica (Tsien et al., 1996).

Por un lado, podría esperarse que el entrenamiento en ambas tareas esté actuando como la inducción de una LTP de las neuronas hipocámpales permitiendo la entrada de calcio por el canal de los receptores NMDA. El aumento en las concentraciones intracelulares de calcio activa proteínas cinasas como CamKII y PKA (Lynch, 2004). La fosforilación de los sustratos de las proteínas cinasas lleva a la activación de cascadas de señalización y factores de transcripción que aumentan la síntesis de proteínas. Si la actividad de las células del engrama persiste se genera un aumento en la fuerza de las conexiones a través de la inducción de una LTP (Tsien et al., 1996; Shi et al., 2001; Lisman et al., 2012). Igualmente, la proteína CaMKII puede autofosforilarse para mantener su actividad independientemente de las concentraciones de calcio. Así, los cambios en las sinapsis activadas pueden mantenerse por más tiempo sin requerir de una mayor entrada de calcio a las células. La LTP involucra cambios funcionales y morfológicos dentro de las células como la inserción de receptores AMPA, la generación de nuevas espinas dendríticas y el aumento general en el número de sinapsis (Bliss y Gardner-Medwin, 1973). La actividad persistente de proteínas como CamKII contribuye al mantenimiento de la LTP al continuar con la fosforilación de los receptores AMPA y funcionar como un switch molecular (Bear et al., 2020). Además, el mantenimiento de los cambios moleculares en las sinapsis activas requiere forzosamente de la síntesis de nuevas proteínas desencadenada por la activación de proteínas como la adenilato ciclasa, PKA, MAPK y CREB (Huang y Kandel, 1995; Kandel, 2001). La activación de receptores glutamatérgicos también provoca el alargamiento de las espinas dendríticas activadas lo cual está asociado con el aumento en las corrientes mediadas por los receptores AMPA dependiente de la activación de receptores NMDA y la polimerización del citoesqueleto de actina (Matzusaki et al., 2004). Los inhibidores de la síntesis de proteínas y los antagonistas de los receptores NMDA pueden bloquear la persistencia de la LTP y afectar la MLP (Lynch, 2004).

Por otro lado, la plasticidad sináptica en el hipocampo puede ser modulada por acción de las catecolaminas (Bethus et al., 2010; Frey et al., 1990; James et al., 2020). La unión de la DA a sus receptores de la familia D1 genera cambios a nivel de las sinapsis que contribuyen al fortalecimiento de las conexiones y a los mecanismos de LTP en el hipocampo. Por ejemplo, se ha observado que durante una tarea de memoria espacial como OLM hay un aumento de las concentraciones de DA y NE en el hipocampo dorsal (Moreno-Castilla et al., 2017). Además, se ha observado que los agonistas de los receptores D1 generan un aumento de la pendiente de los fEPSP en rebanadas hipocámpales que dura por más de una hora (Huang y Kandel, 1995). Asimismo, la unión de NE a los receptores beta-adrenérgicos genera la activación de cascadas de señalización relacionadas con modificaciones transcripcionales a nivel nuclear que involucran mecanismos epigenéticos como la metilación o acetilación del DNA y las histonas (Maity et al., 2016). De esta manera se logra aumentar la síntesis de las proteínas necesarias para la plasticidad sináptica.

Algunos de los mecanismos de plasticidad celular inducidos por la activación específica del LC y que regulan la persistencia de la MLP son la facilitación de LTP en el hipocampo a través de la liberación de DA y NE, la facilitación de los SWR por activación de los receptores beta-adrenérgicos y las modificaciones sobre el control transcripcional en CA1 (Hansen, 2017). Tanto la DA como la NE pueden activar cascadas de señalización relacionadas con la LTP a través de la unión a los receptores acoplados a proteínas Gs: D1/5 y beta-adrenérgicos, respectivamente (Fig. 5) (Smith y Greene, 2012; Otmakhova y Lisman, 1996; Hu et al., 2007). En estados fisiológicos como la atención, la unión de DA y NE a estos receptores generan la activación de la proteína adenilato ciclasa, la cual desencadena la activación de las cascadas de señalización relacionadas con la inducción de LTP en CA1 (Bethus et al., 2010; James et al., 2020). El bloqueo farmacológico de los receptores de la familia D1 y de los receptores beta-adrenérgicos en el hipocampo dorsal interfiere con la consolidación de la memoria espacial (Moreno-Castilla et al., 2017). En resumen, este proyecto resalta la participación del sistema catecolaminérgico en la consolidación de la memoria espacial. La actividad de la DA y la NE liberadas del LC al hipocampo participa en la inducción de cambios plásticos que fortalecen las conexiones neuronales a través de la LTP y mejoran la consolidación de la memoria espacial.

Los resultados de la implementación del protocolo de oLTP muestran un aumento de la pendiente del curso temporal de los fEPSP producto de la estimulación de las terminales catecolaminérgicas en CA1 (Fig. 7). Este aumento puede ser debido a la actividad catecolaminérgica directamente o a la actividad de las catecolaminas liberadas en la vía LC-CA1 o por un aumento de la liberación de glutamato de las colaterales de Schaffer por acción de las catecolaminas en sus receptores presinápticos. No obstante, para determinar esto se requiere hacer el análisis específico de los neurotransmisores liberados en tiempo real por medio de técnicas como microdiálisis y electroforesis capilar o HPLC. De igual manera, para determinar el papel específico de cada uno de los receptores se pueden realizar manipulaciones farmacológicas. De esta forma se obtendría un modelo más completo de los mecanismos subyacentes a la mejora en la consolidación de la memoria espacial producto de la inducción de oLTP en la vía LC-CA1.

La actividad catecolaminérgica en el hipocampo es de suma importancia para la detección de la novedad y la formación de la memoria espacial (Moreno-Castilla et al., 2018). Incluso, se ha reportado que la afectación de la vía LC-CA1 está relacionada con los déficits de memoria en enfermedades neurodegenerativas como el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer (Theofilas et al., 2017; James et al., 2020; Kelly et al., 2017). Asimismo, en psicopatologías como la depresión y la ansiedad se genera un tipo de plasticidad sináptica mal-adaptativa producto de problemas en la señalización catecolaminérgica del LC (Atzori et al., 2016; Devoto y Flore, 2006; Zornetzer y Gold, 1976). Por lo tanto, el mayor entendimiento de la funcionalidad de la vía LC-CA1 durante los procesos de consolidación de la memoria podría ayudar al estudio de los mecanismos subyacentes de plasticidad sináptica e incluso al desarrollo de nuevos tratamientos para algunas condiciones neurológicas.

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo establece que la estimulación óptica de las terminales del LC a CA1 puede inducir una LTP persistente en las neuronas de CA1. Por otro lado, después de la estandarización de la conducta de MWM y BM, encontramos que los ratones que son evaluados 10 días después de la última sesión de entrenamiento tienen un mal desempeño en la prueba de memoria en ambas tareas en comparación a los que son evaluados a las 24 horas, lo que nos indica que el trazo de memoria en este punto temporal no se recupera fácilmente. Sin embargo, los ratones que recibieron el protocolo de inducción de oLTP y fueron evaluados a los 10 días mejoran significativamente su desempeño en ambas tareas de memoria espacial. Por lo tanto, este proyecto brinda una evidencia directa de que la inducción de oLTP hipocámpal a través de la activación de las terminales catecolaminérgicas del LC hacia CA1 aumenta la persistencia de la memoria espacial en las tareas de MWM y BM.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Atzori M, Cuevas-Olguin R, Esquivel-Rendon E, Garcia-Oscos F, Salgado-Delgado RC, Saderi N, Miranda-Morales M, Treviño M, Pineda JC, Salgado H. Locus Ceruleus Norepinephrine Release: A Central Regulator of CNS Spatio-Temporal Activation? *Front Synaptic Neurosci.* 2016 Aug 26;8:25. doi: 10.3389/fnsyn.2016.00025. PMID: 27616990; PMCID: PMC4999448.
- Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979 Feb;93(1):74-104. doi: 10.1037/h0077579. PMID: 221551.
- Barnett, S. C., Perry, B. A. L., Dalrymple-Alford, J. C., y Parr-Brownlie, L. C. (2018). Optogenetic stimulation: Understanding memory and treating deficits. *Hippocampus*, 28(7), 457–470. <https://doi.org/10.1002/hipo.22960>
- Bear, M., Connors, B., y Paradiso, M. A. (2020). *Neuroscience: Exploring the brain*. Jones y Bartlett Learning, LLC.
- Benson, D. L., Schnapp, L. M., Shapiro, L., y Huntley, G. W. (2000, noviembre 1). Making memories stick: Cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends in Cell Biology*, Vol. 10, pp. 473–482. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01838-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01838-9)
- Bethus I, Tse D, Morris RG. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J Neurosci.* 2010 Feb 3;30(5):1610-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2721-09.2010. PMID: 20130171; PMCID: PMC6633999.
- Bliss TV, Goddard GV, Riives M. Reduction of long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat following selective depletion of monoamines. *J Physiol.* 1983 Jan;334:475-91. doi: 10.1113/jphysiol.1983.sp014507. PMID: 6864566; PMCID: PMC1197327.

- Bliss, T. V. P., y Gardner-Medwin, A. R. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 357–374. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>
- Borgkvist A, Malmlöf T, Feltmann K, Lindskog M, Schilström B. Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012 May;15(4):531-40. doi: 10.1017/S1461145711000812. Epub 2011 Jun 14. PMID: 21669025.
- Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., y Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8(9), 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*. 2011 Jul 20;(53):2920. doi: 10.3791/2920. PMID: 21808223; PMCID: PMC3347885.
- Citri, A., y Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 33, 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- da Silva WC, Köhler CC, Radiske A, Cammarota M. D1/D5 dopamine receptors modulate spatial memory formation. *Neurobiol Learn Mem*. 2012 Feb;97(2):271-5. doi: 10.1016/j.nlm.2012.01.005. Epub 2012 Jan 14. PMID: 22266268.
- De Bundel D, Femenía T, DuPont CM, Konradsson-Geuken Å, Feltmann K, Schilström B, Lindskog M. Hippocampal and prefrontal dopamine D1/5 receptor involvement in the memory-enhancing effect of reboxetine. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Oct;16(9):2041-51. doi: 10.1017/S1461145713000370. Epub 2013 May 14. PMID: 23672849.
- Devauges V, Sara SJ. Memory retrieval enhancement by locus coeruleus stimulation: evidence for mediation by beta-receptors. *Behav Brain Res*. 1991 Apr 18;43(1):93-7. doi: 10.1016/s0166-4328(05)80056-7. PMID: 1650233.
- Devoto P, Flore G, Saba P, Fà M, Gessa GL. Co-release of noradrenaline and dopamine in the cerebral cortex elicited by single train and repeated train stimulation of the locus coeruleus. *BMC Neurosci*. 2005 May 2;6:31. doi: 10.1186/1471-2202-6-31. PMID: 15865626; PMCID: PMC1134661.
- Devoto P, Flore G. On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Curr Neuropharmacol*. 2006 Apr;4(2):115-25. doi: 10.2174/157015906776359559. PMID: 18615131; PMCID: PMC2430672.
- Dietz B, Manahan-Vaughan D. Hippocampal long-term depression is facilitated by the acquisition and updating of memory of spatial auditory content and requires mGlu5

activation. *Neuropharmacology*. 2017 Mar 15;115:30-41. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.026. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27055771.

- Disterhoft JF, De Jonge M. Associative learning and long-term potentiation: cellular mechanisms compared. *Int J Neurol*. 1987-1988;21-22:172-83. PMID: 2980687.
- Domjan, M. (2007). *Principios de aprendizaje y conducta*. Recuperado de <https://books.google.com/books?hl=es&lr=yid=RsPOBDhRjwgCyoifndypg=PR2ydq=domjan+principios+de+aprendizaje+y+conductayots=SU4n5ZzO9Wysig=5sY3rBzHk-dj8VklMy0QVQbKIJl>
- Eichenbaum H. Memory: Organization and Control. *Annu Rev Psychol*. 2017 Jan 3;68:19-45. doi: 10.1146/annurev-psych-010416-044131. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27687117; PMCID: PMC5499681.
- Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr*. 2007 Jun;137(6 Suppl 1):1539S-1547S; discussion 1548S. doi: 10.1093/jn/137.6.1539S. PMID: 17513421.
- Frey S, Bergado-Rosado J, Seidenbecher T, Pape HC, Frey JU. Reinforcement of early long-term potentiation (early-LTP) in dentate gyrus by stimulation of the basolateral amygdala: heterosynaptic induction mechanisms of late-LTP. *J Neurosci*. 2001 May 15;21(10):3697-703. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-10-03697.2001. PMID: 11331399; PMCID: PMC6762502.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*. 1993 Jun 11;260(5114):1661-4. doi: 10.1126/science.8389057. PMID: 8389057.
- Frey U, Matthies H, Reymann KG, Matthies H. The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neurosci Lett*. 1991 Aug 5;129(1):111-4. doi: 10.1016/0304-3940(91)90732-9. PMID: 1833673.
- Frey U, Schroeder H, Matthies H. Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res*. 1990 Jul 2;522(1):69-75. doi: 10.1016/0006-8993(90)91578-5. PMID: 1977494.
- Gálvez-Márquez D.K., Salgado-Ménez M., Moreno-Castilla P., Rodríguez-Durán L., Escobar-Rodríguez M.L., Tecuapetla-Aguilar F. and Bermúdez-Rattoni F. Contextual recognition memory updating is modulated by catecholaminergic terminals in the dorsal hippocampus from the locus coeruleus. En revision PNAS.
- Gelinás JN, Banko JL, Hou L, Sonenberg N, Weeber EJ, Klann E, Nguyen PV. ERK and mTOR signaling couple beta-adrenergic receptors to translation initiation machinery to gate induction of protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27527-27535. doi: 10.1074/jbc.M701077200. Epub 2007 Jul 16. PMID: 17635924.

- Gil-Lievana E, Balderas I, Moreno-Castilla P, Luis-Islas J, McDevitt RA, Tecuapetla F, Gutierrez R, Bonci A, Bermúdez-Rattoni F. Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory. *Commun Biol.* 2020 Mar 20;3(1):139. doi: 10.1038/s42003-020-0862-z. PMID: 32198461; PMCID: PMC7083952.
- Gribkoff VK, Ashe JH. Modulation by dopamine of population responses and cell membrane properties of hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Res.* 1984 Feb 6;292(2):327-38. doi: 10.1016/0006-8993(84)90768-6. PMID: 6318915.
- Guiard BP, El Mansari M, Blier P. Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol Pharmacol.* 2008 Nov;74(5):1463-75. doi: 10.1124/mol.108.048033. Epub 2008 Aug 14. PMID: 18703671.
- Guzmán-Ramos K, Osorio-Gómez D, Bermúdez-Rattoni F. Cognitive Impairment in Alzheimer's and Metabolic Diseases: A Catecholaminergic Hypothesis. *Neuroscience.* 2022 Aug 10;497:308-323. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.05.031. Epub 2022 May 30. PMID: 35654292.
- Hahn JD, Swanson LW, Bowman I, Foster NN, Zingg B, Bienkowski MS, Hintiryan H, Dong HW. An open access mouse brain flatmap and upgraded rat and human brain flatmaps based on current reference atlases. *J Comp Neurol.* 2021 Feb;529(3):576-594. doi: 10.1002/cne.24966. Epub 2020 Jul 19. PMID: 32511750; PMCID: PMC7721992.
- Hansen N, Manahan-Vaughan D. Hippocampal long-term potentiation that is elicited by perforant path stimulation or that occurs in conjunction with spatial learning is tightly controlled by beta-adrenoreceptors and the locus coeruleus. *Hippocampus.* 2015 Nov;25(11):1285-98. doi: 10.1002/hipo.22436. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25727388; PMCID: PMC6680149.
- Hansen N. The Longevity of Hippocampus-Dependent Memory Is Orchestrated by the Locus Coeruleus-Noradrenergic System. *Neural Plast.* 2017;2017:2727602. doi: 10.1155/2017/2727602. Epub 2017 Jun 11. PMID: 28695015; PMCID: PMC5485371.
- Hu H, Real E, Takamiya K, Kang MG, Ledoux J, Haganir RL, Malinow R. Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell.* 2007 Oct 5;131(1):160-73. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.017. PMID: 17923095.
- Huang, Y. Y., y Kandel, E. R. (1995). D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2446–2450. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2446>
- Illouz T, Madar R, Clague C, Griffioen KJ, Louzoun Y, Okun E. Unbiased classification of spatial strategies in the Barnes maze. *Bioinformatics.* 2016 Nov 1;32(21):3314-3320. doi: 10.1093/bioinformatics/btw376. Epub 2016 Jul 4. PMID: 27378295.

- James T, Kula B, Choi S, Khan SS, Bekar LK, Smith NA. Locus coeruleus in memory formation and Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci.* 2020 Nov 15:10.1111/ejn.15045. doi: 10.1111/ejn.15045. Epub ahead of print. PMID: 33190318; PMCID: PMC8121900.
- Jay TM. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol.* 2003 Apr;69(6):375-90. doi: 10.1016/s0301-0082(03)00085-6. PMID: 12880632.
- Kandel, E. R. (2001, noviembre 2). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*, Vol. 294, pp. 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kapadia M, Xu J, Sakic B. The water maze paradigm in experimental studies of chronic cognitive disorders: Theory, protocols, analysis, and inference. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016 Sep;68:195-217. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.016. Epub 2016 May 24. PMID: 27229758.
- Kaufman AM, Geiller T, Losonczy A. A Role for the Locus Coeruleus in Hippocampal CA1 Place Cell Reorganization during Spatial Reward Learning. *Neuron.* 2020 Mar 18;105(6):1018-1026.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2019.12.029. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31980319; PMCID: PMC7265133.
- Kawahara H, Kawahara Y, Westerink BH. The noradrenaline-dopamine interaction in the rat medial prefrontal cortex studied by multi-probe microdialysis. *Eur J Pharmacol.* 2001 Apr 27;418(3):177-86. doi: 10.1016/s0014-2999(01)00863-9. PMID: 11343687.
- Kelly SC, He B, Perez SE, Ginsberg SD, Mufson EJ, Counts SE. Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2017 Jan 21;5(1):8. doi: 10.1186/s40478-017-0411-2. PMID: 28109312; PMCID: PMC5251221.
- Kempadoo KA, Mosharov EV, Choi SJ, Sulzer D, Kandel ER. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Dec 20;113(51):14835-14840. doi: 10.1073/pnas.1616515114. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27930324; PMCID: PMC5187750.
- Kentros CG, Agnihotri NT, Streater S, Hawkins RD, Kandel ER. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. *Neuron.* 2004 Apr 22;42(2):283-95. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00192-8. PMID: 15091343.
- Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol.* 2015 Dec 7;25(23):R1116-21. doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049. PMID: 26654366.
- Krebs RM, Schott BH, Düzel E. Personality traits are differentially associated with patterns of reward and novelty processing in the human substantia nigra/ventral tegmental area. *Biol Psychiatry.* 2009 Jan 15;65(2):103-10. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.08.019. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18835480.

- Lemon N, Aydin-Abidin S, Funke K, Manahan-Vaughan D. Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on beta-adrenergic receptor activation. *Cereb Cortex*. 2009 Dec;19(12):2827-37. doi: 10.1093/cercor/bhp065. Epub 2009 May 11. PMID: 19435710; PMCID: PMC2774396.
- Lemon N, Manahan-Vaughan D. Dopamine D1/D5 receptors contribute to de novo hippocampal LTD mediated by novel spatial exploration or locus coeruleus activity. *Cereb Cortex*. 2012 Sep;22(9):2131-8. doi: 10.1093/cercor/bhr297. Epub 2011 Oct 29. PMID: 22038910; PMCID: PMC3412443.
- Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci*. 2003 May;6(5):526-31. doi: 10.1038/nn1049. PMID: 12704392.
- Lisman J, Grace AA, Duzel E. A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci*. 2011 Oct;34(10):536-47. doi: 10.1016/j.tins.2011.07.006. Epub 2011 Aug 17. PMID: 21851992; PMCID: PMC3183413.
- Lisman JE, Otmakhova NA. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus*. 2001;11(5):551-68. doi: 10.1002/hipo.1071. PMID: 11732708.
- Lisman, J., Yasuda, R., y Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(3), 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Ljungberg T, Apicella P, Schultz W. Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol*. 1992 Jan;67(1):145-63. doi: 10.1152/jn.1992.67.1.145. PMID: 1552316.
- Lombroso, P., y Ogren, M. (2009). Learning and memory, part II: Molecular mechanisms of synaptic plasticity. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 48(1), 5–9. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e318190c4b3>
- Loughlin SE, Foote SL, Grzanna R. Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience*. 1986 Jun;18(2):307-19. doi: 10.1016/0306-4522(86)90156-9. PMID: 3736861.
- Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):87-136. doi: 10.1152/physrev.00014.2003. PMID: 14715912.
- Magee JC, Grienberger C. Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annu Rev Neurosci*. 2020 Jul 8;43:95-117. doi: 10.1146/annurev-neuro-090919-022842. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32075520
- Maity S, Jarome TJ, Blair J, Lubin FD, Nguyen PV. Noradrenaline goes nuclear: epigenetic modifications during long-lasting synaptic potentiation triggered by activation of β -

adrenergic receptors. *J Physiol.* 2016 Feb 15;594(4):863-81. doi: 10.1113/JP271432. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26574176; PMCID: PMC4753274.

- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:649-711. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649. PMID: 10845078.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., y Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(6993), 761–766. <https://doi.org/10.1038/nature02617>
- McNamara CG, Tejero-Cantero Á, Trouche S, Campo-Urriza N, Dupret D. Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. *Nat Neurosci.* 2014 Dec;17(12):1658-60. doi: 10.1038/nn.3843. Epub 2014 Oct 19. PMID: 25326690; PMCID: PMC4241115.
- McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993 Jan-Apr;18(1):33-49. doi: 10.1016/0165-0173(93)90006-I. PMID: 8467349.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000 Apr;130(4S Suppl):1007S-15S. doi: 10.1093/jn/130.4.1007S. PMID: 10736372.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science.* 1968 May 3;160(3827):554-5. doi: 10.1126/science.160.3827.554. PMID: 5689415.
- Moncada D, Viola H. Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: evidence for a behavioral tagging. *J Neurosci.* 2007 Jul 11;27(28):7476-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007. PMID: 17626208; PMCID: PMC6672624.
- Moncada D. Evidence of VTA and LC control of protein synthesis required for the behavioral tagging process. *Neurobiol Learn Mem.* 2017 Feb;138:226-237. doi: 10.1016/j.nlm.2016.06.003. Epub 2016 Jun 9. PMID: 27291857.
- Moreno-Castilla P, Pérez-Ortega R, Violante-Soria V, Balderas I, Bermúdez-Rattoni F. Hippocampal release of dopamine and norepinephrine encodes novel contextual information. *Hippocampus.* 2017 May;27(5):547-557. doi: 10.1002/hipo.22711. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28176408.
- Moreno-Castilla Perla, Kioko Guzman-Ramos, Federico Bermudez-Rattoni, Chapter 28 - Object Recognition and Object Location Recognition Memory – The Role of Dopamine and Noradrenaline, Editor(s): Abdel Ennaceur, Maria Angelica de Souza Silva, Handbook of Behavioral Neuroscience, Elsevier, Volume 27,2018, Pages 403-413, ISSN 1569-7339, ISBN 9780128120125, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812012-5.00028-8>.

- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986 Feb 27-Mar 5;319(6056):774-6. doi: 10.1038/319774a0. PMID: 2869411.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984 May;11(1):47-60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4. PMID: 6471907.
- Morris RG. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging, and schemas. *Eur J Neurosci*. 2006 Jun;23(11):2829-46. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04888.x. PMID: 16819972.
- Moscovitch M, Nadel L. Consolidation and the hippocampal complex revisited: in defense of the multiple-trace model. *Curr Opin Neurobiol*. 1998 Apr;8(2):297-300. doi: 10.1016/s0959-4388(98)80155-4. PMID: 9635217.
- Moser EI, Kropff E, Moser MB. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:69-89. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723. PMID: 18284371.
- Murchison CF, Schutsky K, Jin SH, Thomas SA. Norepinephrine and β_1 -adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval. *Neuroscience*. 2011 May 5;181:109-16. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.049. Epub 2011 Mar 4. PMID: 21377513; PMCID: PMC3074031.
- Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, Ouyang M, Lee A, Thomas SA. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell*. 2004 Apr 2;117(1):131-43. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00259-4. PMID: 15066288.
- Muzzio IA, Levita L, Kulkarni J, Monaco J, Kentros C, Stead M, Abbott LF, Kandel ER. Attention enhances the retrieval and stability of visuospatial and olfactory representations in the dorsal hippocampus. *PLoS Biol*. 2009 Jun 30;7(6):e1000140. doi: 10.1371/journal.pbio.1000140. Epub 2009 Jun 30. Erratum in: *PLoS Biol*. 2010;8(10). doi: 10.1371/annotation/5e28240c-6186-43eb-b319-79c391d9468a. Erratum in: *PLoS Biol*. 2010;8(10). doi: 10.1371/annotation/d0e5ef6f-d08b-474a-8fde-aebeee7369d. PMID: 19564903; PMCID: PMC2696347.
- Nadel L, Maurer AP. Recalling Lashley and reconsolidating Hebb. *Hippocampus*. 2020 Aug;30(8):776-793. doi: 10.1002/hipo.23027. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30216593; PMCID: PMC6417981.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):13940-5. doi: 10.1073/pnas.1936192100. Epub 2003 Nov 13. PMID: 14615590; PMCID: PMC283525.

- Nakahata Y, Yasuda R. Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Front Synaptic Neurosci.* 2018 Aug 29;10:29. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00029. PMID: 30210329; PMCID: PMC6123351.
- Neuman RS, Harley CW. Long-lasting potentiation of the dentate gyrus population spike by norepinephrine. *Brain Res.* 1983 Aug 22;273(1):162-5. doi: 10.1016/0006-8993(83)91106-x. PMID: 6311345.
- Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015>
- Nishizaki T. IL-33 Acts to Express Schaffer Collateral/CA1 LTP and Regulate Learning and Memory by Targeting MyD88. *Neural Plast.* 2017;2017:2531453. doi: 10.1155/2017/2531453. Epub 2017 Sep 24. PMID: 29147584; PMCID: PMC5632899.
- O'Carroll CM, Martin SJ, Sandin J, Frenguelli B, Morris RG. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn Mem.* 2006 Nov-Dec;13(6):760-9. doi: 10.1101/lm.321006. PMID: 17142305; PMCID: PMC1783630.
- O'Keefe J. Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information? *Hippocampus.* 1999;9(4):352-64. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:4<352::AID-HIPO3>3.0.CO;2-1. PMID: 10495018.
- Otmakhova NA, Lisman JE. D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci.* 1996 Dec 1;16(23):7478-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-23-07478.1996. PMID: 8922403; PMCID: PMC6579102.
- Patil SS, Sunyer B, Höger H, Lubec G. Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the Multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2009 Mar 2;198(1):58-68. doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.029. Epub 2008 Oct 31. PMID: 19022298.
- Pitts MW. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio Protoc.* 2018 Mar 5;8(5):e2744. doi: 10.21769/bioprotoc.2744. PMID: 29651452; PMCID: PMC5891830.
- Quinlan MAL, Strong VM, Skinner DM, Martin GM, Harley CW, Walling SG. Locus Coeruleus Optogenetic Light Activation Induces Long-Term Potentiation of Perforant Path Population Spike Amplitude in Rat Dentate Gyrus. *Front Syst Neurosci.* 2019 Jan 9;12:67. doi: 10.3389/fnsys.2018.00067. PMID: 30687027; PMCID: PMC6333706.
- Redish AD, Touretzky DS. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput.* 1998 Jan 1;10(1):73-111. doi: 10.1162/089976698300017908. PMID: 9501505.
- Roy DS, Arons A, Mitchell TI, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature.* 2016 Mar

24;531(7595):508-12. doi: 10.1038/nature17172. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26982728; PMCID: PMC4847731.

- Rosen ZB, Cheung S, Siegelbaum SA. Midbrain dopamine neurons bidirectionally regulate CA3-CA1 synaptic drive. *Nat Neurosci*. 2015 Dec;18(12):1763-71. doi: 10.1038/nn.4152. Epub 2015 Nov 2. PMID: 26523642.
- Rowan, B. A., Seymour, D. K., Chae, E., Lundberg, D. S., y Weigel, D. (2017). Methods for genotyping-by-sequencing. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1492, pp. 221–242). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6442-0_16
- Sadeghian A, Fathollahi Y, Javan M, Shojaei A, Kosarmadar N, Rezaei M, Mirnajafi-Zadeh J. Spatial Learning and Memory in Barnes Maze Test and Synaptic Potentiation in Schaffer Collateral-CA1 Synapses of Dorsal Hippocampus in Freely Moving Rats. *Basic Clin Neurosci*. 2019 Sep-Oct;10(5):461-468. doi: 10.32598/bcn.9.10.330. Epub 2019 Sep 1. PMID: 32284835; PMCID: PMC7149949.
- Sara SJ, Devauges V. Priming stimulation of locus coeruleus facilitates memory retrieval in the rat. *Brain Res*. 1988 Jan 12;438(1-2):299-303. doi: 10.1016/0006-8993(88)91351-0. PMID: 3345434.
- Sara SJ. Reactivation, retrieval, replay and reconsolidation in and out of sleep: connecting the dots. *Front Behav Neurosci*. 2010 Dec 13;4:185. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00185. PMID: 21179586; PMCID: PMC3004439.
- Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci*. 2010 Oct 23;87(17-18):521-36. doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.004. Epub 2010 Sep 15. PMID: 20837032; PMCID: PMC6457258.
- Shi, S. H., Hayashi, Y., Esteban, J. A., y Malinow, R. (2001). Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell*, 105(3), 331–343. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00321-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00321-X)
- Smith CC, Greene RW. CNS dopamine transmission mediated by noradrenergic innervation. *J Neurosci*. 2012 May 2;32(18):6072-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6486-11.2012. PMID: 22553014; PMCID: PMC3371362.
- Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Aug 3;7(8):a021766. doi: 10.1101/cshperspect.a021766. PMID: 26238360; PMCID: PMC4526749.
- Squire LR, Wixted JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:259-88. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113720. PMID: 21456960; PMCID: PMC3192650.

- Sun H, Mao Y, Wang J, Ma Y. Effects of beta-adrenergic antagonist, propranolol on spatial memory and exploratory behavior in mice. *Neurosci Lett*. 2011 Jul 8;498(2):133-7. doi: 10.1016/j.neulet.2011.04.076. Epub 2011 May 6. PMID: 21571035.
- Takeuchi T, Duszkiewicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanabe M, Smith CC, Fernández G, Deisseroth K, Greene RW, Morris RG. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature*. 2016 Sep 15;537(7620):357-362. doi: 10.1038/nature19325. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27602521; PMCID: PMC5161591.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*. 1999 Sep 2;401(6748):63-9. doi: 10.1038/43432. PMID: 10485705.
- Theofilas P, Ehrenberg AJ, Dunlop S, Di Lorenzo Alho AT, Nguy A, Leite REP, Rodriguez RD, Mejia MB, Suemoto CK, Ferretti-Rebustini REL, Polichiso L, Nascimento CF, Seeley WW, Nitri R, Pasqualucci CA, Jacob Filho W, Rueb U, Neuhaus J, Heinsen H, Grinberg LT. Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: A stereological study in human postmortem brains with potential implication for early-stage biomarker discovery. *Alzheimers Dement*. 2017 Mar;13(3):236-246. doi: 10.1016/j.jalz.2016.06.2362. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27513978; PMCID: PMC5298942.
- Tronson NC, Taylor JR. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Apr;8(4):262-75. doi: 10.1038/nrn2090. PMID: 17342174.
- Tsetsenis T, Badyna JK, Li R, Dani JA. Activation of a Locus Coeruleus to Dorsal Hippocampus Noradrenergic Circuit Facilitates Associative Learning. *Front Cell Neurosci*. 2022 Apr 15;16:887679. doi: 10.3389/fncel.2022.887679. PMID: 35496910; PMCID: PMC9051520.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1327-38. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81827-9. PMID: 8980238.
- Vankov A, Hervé-Minvielle A, Sara SJ. Response to novelty and its rapid habituation in locus coeruleus neurons of the freely exploring rat. *Eur J Neurosci*. 1995 Jun 1;7(6):1180-7. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb01108.x. PMID: 7582091.
- Volianskis, A., France, G., Jensen, M. S., Bortolotto, Z. A., Jane, D. E., y Collingridge, G. L. (2015). Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Research*, 1621, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.016>
- Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1(2):848-58. doi: 10.1038/nprot.2006.116. PMID: 17406317; PMCID: PMC2895266.
- Walling SG, Harley CW. Locus ceruleus activation initiates delayed synaptic potentiation of perforant path input to the dentate gyrus in awake rats: a novel beta-adrenergic- and protein synthesis-dependent mammalian plasticity mechanism. *J Neurosci*. 2004 Jan

21;24(3):598-604. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4426-03.2004. PMID: 14736844; PMCID: PMC6729256.

- Wang F, Wan P, Wang W, Xiao B, Jin H, Jin Q. Dopamine in the hippocampal dentate gyrus modulates spatial learning via D1-like receptors. *Brain Res Bull.* 2019 Jan;144:101-107. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.11.010. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30472150.
- Wang SH, Redondo RL, Morris RG. Relevance of synaptic tagging and capture to the persistence of long-term potentiation and everyday spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 9;107(45):19537-42. doi: 10.1073/pnas.1008638107. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20962282; PMCID: PMC2984182.
- Wang SH. Novelty enhances memory persistence and remediates propranolol-induced deficit via reconsolidation. *Neuropharmacology.* 2018 Oct;141:42-54. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.015. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30125560; PMCID: PMC6178872.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* 2006 Aug 25;313(5790):1093-7. doi: 10.1126/science.1128134. PMID: 16931756.
- Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jun;5(6):483-94. doi: 10.1038/nrn1406. PMID: 15152198.
- Xie, Y., Jackson, M. F., y MacDonald, J. F. (2013). Optogenetics and synaptic plasticity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(11), 1381–1385. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.150>
- Xing B, Kong H, Meng X, Wei SG, Xu M, Li SB. Dopamine D1 but not D3 receptor is critical for spatial learning and related signaling in the hippocampus. *Neuroscience.* 2010 Sep 15;169(4):1511-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.034. Epub 2010 Jun 22. PMID: 20600656.
- Yavich L, Jäkälä P, Tanila H. Noradrenaline overflow in mouse dentate gyrus following locus coeruleus and natural stimulation: real-time monitoring by in vivo voltammetry. *J Neurochem.* 2005 Nov;95(3):641-50. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03390.x. PMID: 16248883.
- Yizhar, O., Fenno, L. E., Davidson, T. J., Mogri, M., y Deisseroth, K. (2011, julio 14). Optogenetics in Neural Systems. *Neuron*, Vol. 71, pp. 9–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06>.
- Zald DH, Cowan RL, Riccardi P, Baldwin RM, Ansari MS, Li R, Shelby ES, Smith CE, McHugo M, Kessler RM. Midbrain dopamine receptor availability is inversely associated with novelty-seeking traits in humans. *J Neurosci.* 2008 Dec 31;28(53):14372-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2423-08.2008. PMID: 19118170; PMCID: PMC2748420.
- Zornetzer SF, Gold MS. The locus coeruleus: its possible role in memory consolidation. *Physiol Behav.* 1976 Mar;16(3):331-6. doi: 10.1016/0031-9384(76)90140-2. PMID: 186825.

