



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**VARIACIONES DIURNAS DEL EFECTO DE LA CORTISTATINA SOBRE  
LA EVOCACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL EN LA RATA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

**MÉNDEZ DÍAZ, MÓNICA**

ASESOR: PROSPERO GARCIA, OSCAR

MÉXICO, D. F.

2006



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.



Méndez-Díaz, M.  
Variaciones diurnas del efecto...

# **VARIACIONES DIURNAS DEL EFECTO DE LA CORTISTATINA SOBRE LA EVOCACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL EN LA RATA.**

QFB Mónica Méndez Díaz

Tutor: Dr. Oscar Próspero García

Grupo de Neurociencias

Depto. de Fisiología

Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

Tel: 56 23 25 09

e-mail: mendezm@servidor.unam.mx



Méndez-Díaz, M.  
Variaciones diurnas del efecto...

Con amor para mis hijos Aline y Víctor.



## AGRADECIMIENTOS

A Víctor Mendoza Fernández

Por que un día nos atrevimos a compartir los sueños, y desde entonces nos atrevimos a hacer los sueños realidad. Porque desde entonces los hemos logrado todos.

Gracias por creer ciegamente en mí,

por creer en mi concepto de familia,

por el apoyo incondicional,

por las diferencias y por la ausencia.

Gracias por ser el padre ideal de nuestros hijos,

gracias por llevarlos todas las noches a la luna

y de regreso cuando les contabas un cuento para dormir.

Gracias por estar a mi lado cuando estoy sola,

por estar conmigo cuando no puedo estar sola

y me compartes con 2 horas de psicoterapia y 20 mg de paxil.

Gracias por compartir los éxitos y los tropiezos

y por seguir conmigo después de la evolución.

Por lo que somos hoy y por el mañana.

“Quien obtiene una victoria sobre otros hombres es fuerte, pero quien obtiene una victoria sobre sí mismo es

todo poderoso”. LAO TSÉ



## Aline

Hace mas de 20 años tu papá me escribió un cuento, donde describía a una niña preciosa, con enormes ojos cafés y belleza singular, que llamaba la atención de la gente donde quiera que ella se encontrara, porque iba por todos lados regalando sonrisas, abrazos, besos. Era peculiar hablar con ella porque siempre preguntaba “¿porque?” entonces convertía una respuesta de 10 palabras en una plática interminable. Era muy inteligente, así que a pesar de su corta edad era capaz de conseguir todo lo que deseaba, desde un libro de cuentos hasta un perro. Pero lo más importante es que tenía luz propia, iluminaba con una calida luz blanca el lugar donde se encontraba, iba por ahí derritiendo la nieve, abriendo caminos, llevando música, ofreciendo vida y se llamaba Aline.

Aline, gracias por salirte de ese cuento, tomar vida y estar aquí conmigo. Gracias por compartir tu belleza, tu amor, tu inteligencia, tu alegría conmigo. Gracias por seguir preguntado ¿Por qué? Muchas gracias porque todos los ratos han sido agradables a tu lado. Gracias por tu luz que ha iluminado mi camino hasta aquí.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. Thomas Chalmers



Víctor

Debe ser cierto que naciste se ese enorme roble que se encuentra cruzando la avenida de la casa donde vivimos y que llamabas “árbol sagrado”. Porque eres especial, siempre has tenido en tus manos el elixir que me alivia de cualquier cansancio. Siempre has tenido las palabras mágicas que me hacen reír a carcajadas aunque tenga ganas de llorar. Tienes esa energía maravillosa que me levanta a correr aunque quisiera dormir. Tienes el tacto de hacerme sentir como reina aunque tenga una escoba en la mano. Además tienes esos hermosos ojos negros, transparentes que me dejan ver cuando me equivoco.

Víctor, gracias por compartir conmigo los moustros, fantasmas, duendes, dragones y guerreros, de tu habitación. Gracias por compartir la magia de la vida conmigo. Gracias por estar a mi lado y compartir conmigo este pequeño triunfo.

“Se puede experimentar tanta alegría al proporcionar placer a alguien, que se sienten ganas de darle las gracias”. Henri M. Montherlant



Federico Méndez y Martha Díaz,

Si hay a alguien a quienes debo agradecer infinitamente este logro es a ustedes, por darme la oportunidad de la vida.

Gracias por enseñarme todos los sentimientos que nos hacen humanos, amor, alegría, tristeza, miedo, orgullo.

Gracias por darme la oportunidad de demostrar mi capacidad y mi fortaleza, por dejarme demostrar hasta donde me pueden llevar mis propios pasos y sobre todo gracias por darme los elementos que me han llevado hasta donde estoy.

“Estas tres señales distinguen al hombre superior: La virtud, que lo libra de la ansiedad; la sabiduría, que lo libra de la duda; y el valor, que lo libra del miedo”. Confucio

Maria Fernández y Armando Mendoza,

Gracias por el apoyo incondicional de día y de noche, por la compañía sin importar la hora y la comprensión. Gracias por ayudarme a hacer a un lado las piedras del camino.

Cualquiera puede simpatizar con las penas de un amigo; simpatizar con sus éxitos requiere una naturaleza delicadísima. Oscar Wilde





A mi Maestro, Oscar Prospéro,

Oscar, mil gracias por invitarme al maravilloso mundo de la ciencia, sin ésta nada hubiera sido posible.

Gracias por la sabiduría que compartiste conmigo y por el resto de las herramientas para trabajar. Gracias por compartir conmigo más que ciencia, gracias por el arte, los consejos de buda, el dicho de la abuela, el misticismo, el café, la amistad...

Especialmente, gracias por la paciencia que has tenido para enseñarme a transformar una piedra en un diamante.

“El hombre sabio querrá estar siempre con quien sea mejor que él”. PLATÓN



Gran parte de este trabajo fue llevado a cabo con de mas de una mano derecha. Gracias a, Marina Cisneros, Khalil Guzmán y a Marcela Guevara por compartir conmigo el placer de hacer ciencia, gracias por confiar en los proyectos y por disfrutar los buenos resultados.

“No necesito amigos que cambian cuando yo cambio, y asienten cuando yo asiento. Mi sombra lo hace mucho mejor”. Plutarco

Pavel Rueda, Corine Montes, Edgar Soria, Andrea Herrera Solís, Lizbeth Sánchez, Alejandra Ruiz por la critica, por las ideas y por los seminarios. Dolores Martínez, Oscar Galicia, Manuel Sánchez, Eric Murillo, Oscar Díaz, Luz Navarro, Marina Martínez, Rubén González, porque un día estuvieron y donaron su tiempo, sus ideas y sus valiosos consejos.

“Nadie sabe lo que es capaz de hacer, hasta que trata de hacerlo” MARDEN



Gracias a: Dr. Raúl Aguilar, Dr. Stephan Mijailescu, Dr. Gabriel Roldan, Dra. Magda Giordano, Dr. Mauricio Díaz, Dr. Xavier Velásquez y Dr. David García Díaz que formaron parte de mi comité tutorial y de mi jurado de examen y que sabiamente enriquecieron este proyecto



Méndez-Díaz, M.  
Variaciones diurnas del efecto...

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neuroinfecciones del Grupo de Neurociencias y fue apoyado por el proyecto 25488 de CONACYT otorgado a OPG. También fue apoyado parcialmente por el proyecto G12RR08124 del Research Centres at Minority Institutions Program del National Center for Research Resources, NIH en UTEP.

“La habilidad para recordar posiblemente es la mas significativa y distintiva característica de nuestra vida mental. Somos en gran medida lo que aprendemos y recordamos”.

Mayford y Kandel, 1999.



## Índice

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	1
I INTRODUCCION	
1.1 Los procesos cognoscitivos.....	5
1.2 La clasificación de la memoria.....	7
1.3 Estructuras que regulan los procesos cognoscitivos.....	10
1.4 Fenómenos moleculares de los procesos cognoscitivos	
1.4.1 Neuroquímica.....	18
1.4.2 La cortistatina.....	28
1.4.3 Bases genéticas de la memoria.....	33
1.5 Los ritmos biológicos de la memoria.....	37
II Planteamiento del problema.....	40
III Hipótesis y Objetivos.....	41
IV Material y Método.....	42
V Resultados.....	58
VI Discusión.....	77
VII Conclusiones.....	99
Anexos.....	100
Bibliografía.....	112



## Resumen

El aprendizaje es “el” proceso que lleva a cabo el Sistema Nervioso Central, y para su estudio se ha dividido en subprocesos, tales como la adquisición, la consolidación y la evocación. La memoria, es el almacén de lo que hemos aprendido y se ha clasificado en dependencia a diferentes parámetros. Por ejemplo, en función del tiempo, existe la memoria de corto y de largo plazo. Podemos dividirla también en función de la forma en la que la evocamos, ya sea de manera explícita o implícita. Por otro lado, sabemos que los procesos del aprendizaje son regulados por diferentes estructuras. Por ejemplo, se le ha atribuido al hipocampo un papel en la consolidación de la memoria, así como en la evocación de la misma. También se sabe que la integridad del hipocampo es indispensable para la realización de tareas de navegación, por lo que se postula que almacena un mapa espacial.

Se sabe, que el aprendizaje requiere de una delicada regulación neuroquímica, esto es, diversos aminoácidos, neurotransmisores, péptidos, y proteínas lo modulan, ya sea favoreciendo o inhibiendo la adquisición, la consolidación y/o la evocación de la información. Adicionalmente, la evocación de la memoria no se expresa con una eficiencia constante a lo largo del día, sino que muestra variaciones diurnas, relacionadas con el estado de alerta (sueño-vigilia).



En 1996, se describió la existencia de un péptido regulador del sueño, la Cortistatina (CST), al cual recientemente se le ha involucrado en la modulación de los procesos cognoscitivos. La CST, es un péptido que se ha descrito en el cerebro de humano, de rata y ratón y muestra una alta homología con somatostatina (SST). Se ha observado que la CST modifica la excitabilidad de las neuronas del hipocampo y de la corteza cerebral, estructuras involucradas en la regulación de diversos procesos como los cognoscitivos. Por ejemplo, se ha reportado que este neuropéptido afecta la consolidación y evocación de la memoria. Además, se ha demostrado que la CST incrementa el sueño de ondas lentas.

Aunque se ha reportado que la CST modula el ciclo sueño-vigilia y la consolidación y evocación de la memoria, no se ha reportado aún si este efecto muestra variaciones diurnas, de tal forma que uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar si dichas variaciones existen. Adicionalmente, analizamos si este efecto de la CST exógena es resultado de alterar el metabolismo intracelular a nivel de segunda mensajería y a nivel de genes.

Para cumplir estos objetivos, en el presente trabajo analizamos el resultado de la administración de la CST sobre la ejecución de las ratas en el laberinto de Barnes (LB) el cual se resuelve utilizando memoria espacial y de procedimiento. Estudiamos también el efecto de la CST exógena sobre el ciclo sueño-vigilia. Como un control de la actividad motora, analizamos la ejecución de las ratas en una viga de equilibrio y en un



sistema de Rota Rod (RR). Determinamos la concentración de AMPc un segundo mensajero involucrado a los procesos de la memoria y la matriz de expresión de genes mediante la técnica de los micro-arreglos. El efecto de la CST fue evaluado en diferentes puntos del ciclo luz-oscuridad.

Un objetivo adicional fue analizar si la CST interacciona con otros sistemas de neurotransmisión y de esta forma de alterar otras conductas como la ingesta de alimento y funciones autonómicas como analgesia y temperatura corporal.

Los resultados muestran que la CST exógena interfiere con la ejecución en el LB, modulando la expresión de la memoria de procedimiento. La administración de la CST afecta la concentración de AMPc y la expresión de algunos genes involucrados en el proceso de la memoria en el hipocampo, por ejemplo, el gen de la fosfolipasa C delta 4 y el gen de la sinaptofisina. La administración de la CST no tiene efecto sobre la actividad motora en el RR, pero cuando esta habilidad es evaluada en la viga de equilibrio, la CST la deteriora en la fase de luz del fotoperíodo. Adicionalmente, observamos que el efecto de la CST sobre el ciclo sueño-vigilia tiene variaciones diurnas.

Por otro lado encontramos que la CST exógena incrementa el umbral al dolor producido por calor, incrementa la ingesta de alimento en la fase de luz del ciclo e incrementa la temperatura corporal.





Estos resultados apoyan la hipótesis de que la CST modula los procesos de la memoria regulados por el hipocampo. Considerando que la CST también afecta la respuesta al dolor, la ingesta de alimento y la temperatura corporal, sugerimos que este neuropéptido afecta diversos núcleos cerebrales ya sea a través de su interacción con otros sistemas de neurotransmisión o uniéndose a un receptor de los descritos para SST o a uno propio.



## I INTRODUCCIÓN

### 1.1 Los procesos cognoscitivos

Los procesos cognoscitivos son funciones del Sistema Nervioso que nos permiten entre otras cosas, adquirir, retener y evocar la información. De tal forma que hacer uso cotidiano de estas funciones nos permite tomar ventaja de experiencias previas para resolver los problemas a los que nos enfrentamos diariamente.

El aprendizaje es una de las principales funciones que lleva a cabo el Sistema Nervioso de diversas especies, que incluye desde los organismos pluricelulares menos complejos hasta los mamíferos y constituye la forma de adquirir conocimiento del entorno (Ambroggi y cols, 1999; Kandel y cols, 2000). Como parte del sistema de aprendizaje, la memoria es el almacén de esta información y su existencia es demostrada por la persistencia de modificaciones conductuales, las cuales pueden ser observadas y cuantificadas (Kandel y cols, 2000). Existen otros cambios que no son detectados por la simple observación de la conducta, por ejemplo modificaciones en las propiedades de la membrana celular, en la síntesis de proteínas, en el fortalecimiento sináptico, en la expresión de genes; que igualmente subyacen al aprendizaje y a la memoria (Bailey y cols, 1996; Gall y cols, 1998; Silva y cols, 1998b; Tischmeyer y Grimm, 1999; Kandel, 2000).



En general, se acepta que los procesos cognoscitivos suceden de una manera secuencial. Primero, la información es adquirida, durante este proceso llamado adquisición ocurren cambios a nivel de la membrana celular, resultado de la activación de receptores y la consecuente apertura de canales iónicos, que provocan una activación celular (Milner, y cols, 1998; Kandel, 2000).

Posteriormente, esta información es consolidada, es decir almacenada. A este proceso algunos autores lo consideran como la formación de una huella de memoria, por que la información se vuelve permanente. Para que este fenómeno se lleve a cabo se requiere que la información adquirida haya sido relevante, que esté relacionada con un estímulo significativo o que la adquisición de la información sea repetida en un intervalo de tiempo breve. La consolidación de la memoria involucra la expresión de genes para la síntesis de nuevas proteínas, las cuales generan cambios estructurales (como fortalecimiento de las sinapsis) que permiten el almacenamiento de la información de forma permanente (Milner, y cols, 1998; Kandel, 2000).

Finalmente esta información puede ser evocada por estímulos ambientales y usada para facilitar nuestra adaptación al medio ambiente (Ambroggi y cols, 1999; Kandel, 2000). La evocación requiere de la asociación de diferentes tipos de información, es un proceso constructivo y como tal está sujeto a sufrir distorsiones. La evocación de la información es más efectiva cuando esta ocurre en el mismo contexto en el cual ha sido adquirida y en la presencia de las mismas señales que estuvieron disponibles durante el aprendizaje.



## 1.2 La clasificación de la memoria

La memoria ha sido clasificada para fines de estudio (Goldman-Rakic, 1996; Thompson y Kimm, 1996). Por ejemplo, dependiendo de parámetros temporales, la memoria se considera de corto y de largo plazo (Bailey y cols, 1996). Es memoria de corto plazo, cuando la información aprendida es evocada inmediatamente después de adquirida, aunque después se olvide y de largo plazo cuando la información aprendida se puede evocar después de varios días, meses, y aun a lo largo de toda la vida (Fernández-Ruiz y Bermúdez Rattoni, 2001). Leer un número telefónico por primera vez y luego marcarlo representa un ejemplo de memoria de corto plazo. Repetir el mismo número al día siguiente refleja una memoria de largo plazo.

Milner ha clasificado estos sistemas de memoria, en dos grandes grupos: memoria explícita o declarativa y memoria implícita o no declarativa (Milner, y cols, 1998; Kandel y cols, 2000). La memoria declarativa comprende a la memoria de los hechos y eventos. La memoria de los hechos o semántica, se refiere al almacén de hechos y conceptos que no están relacionados a un tiempo y lugar particular y es evocada verbalmente. La memoria de eventos también llamada episódica, se refiere al almacén de incidentes que ocurren en un tiempo y lugar particular en el pasado de una persona y se evoca de forma verbal, por ejemplo al relatar experiencias, escenas familiares, lugares, etc. (Squire, 1987; Milner, y cols, 1998; Kandel y cols, 2000). (Figura 1).



La memoria implícita (de procedimiento) tiene cuatro subsistemas: el primero de ellos se refiere al almacén de secuencias de movimientos que nos permite tener hábitos y habilidades, entendiendo como hábitos aquellas conductas que utilizamos cotidianamente. Mientras las habilidades, se refieren a la destreza con que desempeñamos estas conductas. El segundo subsistema es el “priming”, que se define como el incremento en la habilidad para identificar estímulos, resultado de la exposición previa a información relacionada con dicho estímulo. Por ejemplo, cuando se muestran a un sujeto las primeras letras de algunas palabras y se le pide que las complete, si ha leído con anterioridad un texto que incluya algunas palabras que contengan al inicio las mismas letras, estas serán las palabras que utilizará para completar la tarea que se le pidió (Milner, y cols, 1998; Kandel y cols, 2000).

El siguiente es el aprendizaje asociativo, el cual involucra el establecimiento de una relación entre dos eventos no relacionados, como ocurre en el condicionamiento clásico, que es la manera en la que un sujeto aprende a predecir eventos en el medio ambiente. Este se divide a su vez en el condicionamiento de las respuestas emocionales y las musculares. Finalmente el aprendizaje no asociativo, es la forma más básica de aprendizaje e involucra el efecto de un solo estímulo. Existen dos tipos de aprendizaje no asociativo, la habituación (decremento en la respuesta a un mismo estímulo), y la sensibilización (incremento en la magnitud de la respuesta a un mismo estímulo, el cual nos había generado previamente una respuesta característica) (Milner y cols, 1998; Kandel y cols, 2000)



Aunque los animales no pueden expresar lo que han aprendido mediante una declaración verbal, es posible estudiar este tipo de memoria evaluando la eficiencia para resolver tareas (códigos de repuesta) que sugieren una memoria declarativa (modelos animales de memoria declarativa). Por ejemplo, en los primates no humanos las pruebas de reconocimiento visual se han asociado con el lóbulo medial temporal. En las ratas y otros mamíferos, el hipocampo desempeña un papel importante en el procesamiento de este tipo de memoria, particularmente en la resolución de tareas de tipo espacial (Squire 1987, Savage y cols, 2004).

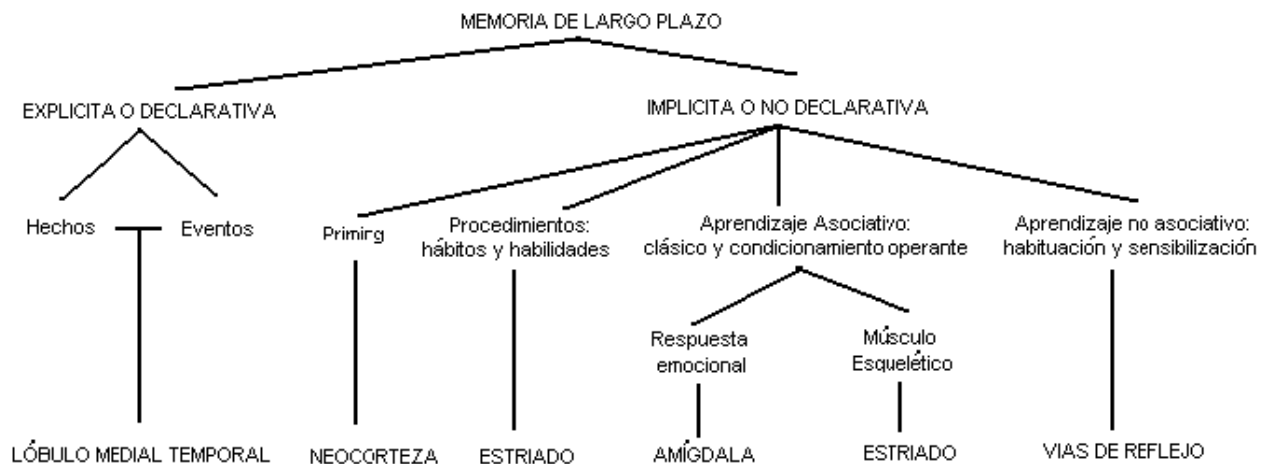


Figura 1 Clasificación de la memoria. En éste diagrama podemos observar la clasificación de la memoria sugerida por B. Milner (Milner, y cols, 1998) y los sustratos neuroanatómicos responsables de su modulación. La memoria declarativa es regulada por el lóbulo medial temporal y la memoria no declarativa esta mediada por estructuras cerebrales localizadas fuera del lóbulo medial temporal como son el caudado-putámen y sistemas involucrados en la regulación de la ejecución. Esquema modificado de Kandel y cols, 2000.



### 1.3 Las estructuras que regulan los procesos cognoscitivos

Uno de los principales problemas del estudio de la memoria es determinar en que estructuras del sistema nervioso central (SNC) se puede almacenar. En este contexto, las diversas enfermedades que dañan partes específicas del cerebro y que afectan la memoria, han permitido describir los sustratos neuroanatómicos de la misma. Por ejemplo, el paciente llamado HM, quien padecía epilepsia del lóbulo temporal (Figura 2), fue sometido a cirugía para la remoción bilateral de dicho lóbulo para el alivio las convulsiones. Sin embargo, a pesar del beneficio, HM desarrolló alteraciones peculiares en sus procesos cognoscitivos. Scoville y Milner (Milner y cols, 1998; Scoville y Milner, 2000) reportaron que HM era incapaz de formar nuevos recuerdos (memoria de corto plazo), mientras que sus recuerdos remotos (memoria de largo plazo) permanecieron intactos. HM podía seguir una conversación, sino era distraído de esta; es decir, su memoria de corto plazo funcionaba perfectamente. Adicionalmente HM tenía dificultad con la adquisición de la memoria espacial (Milner y cols, 1998; Scoville y Milner, 2000).

La existencia de HM y de otros pacientes con daños cerebrales, así como estudios en primates no humanos han permitido sugerir que el lóbulo medial temporal es una estructura fundamental para el almacenamiento de la memoria declarativa (Figura 1). Dentro de esta región se ha propuesto a la formación hipocampal (hipocampo, giro dentado, subiculum y corteza entorrinal), así como a las cortezas



perirrinal y parahipocampal como estructuras involucradas en el almacenamiento de la memoria declarativa en humanos (Squire, 1987; Milner, 1995; Thompson, 1996; Milner y cols, 1998; Kandel y cols, 2000). Aparentemente no es necesario remover o tener lesionada la totalidad del lóbulo temporal o del hipocampo para que los sujetos muestren incapacidad para explorar eficientemente nuevos ambientes (Cho y cols, 1998; Burger y cols, 2006).

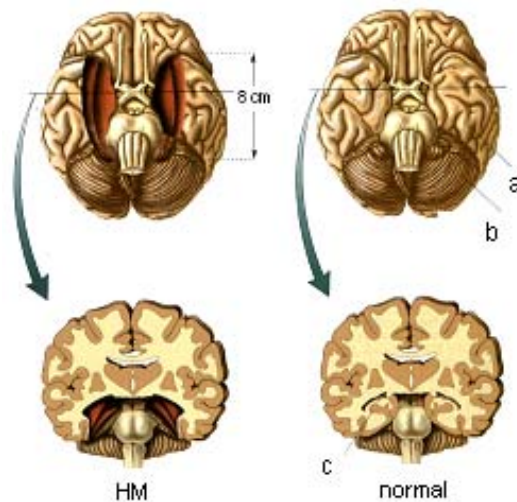


Figura 2. Este dibujo muestra las partes que fueron removidas del cerebro de HM. En a señala al lóbulo temporal, en b al cerebelo y en c al hipocampo, de un cerebro normal.

Diversos estudios han sugerido que el hipocampo es una estructura que participa en la regulación de la memoria espacial. Se requiere la integridad del hipocampo para el aprendizaje y la consolidación de este tipo de memoria. (Gall y cols, 1998; Cho y cols, 1998; Kandel y cols, 2000; Rolls, 2000, Burger y cols, 2006). La memoria espacial es aquella que involucra la habilidad para adquirir y retener asociaciones de características ambientales. Estas asociaciones permiten a los organismos explorar un





espacio. Este tipo de memoria puede ser evaluada utilizando diversos modelos como el laberinto en “T”, laberinto radial, el laberinto acuático de Morris y el LB, tomando ventaja de que los roedores son excelentes exploradores y aprenden rápidamente a resolver muy bien este tipo de pruebas. Diversos autores han reportado consistentemente que los animales con el hipocampo lesionado muestran un deterioro en su habilidad para aprender a resolver el laberinto radial, el laberinto acuático de Morris y el LB (Barnes, 1979; Kandel y cols, 2000). La destrucción de las neuronas hipocámpales por métodos farmacológicos, por ejemplo con ácido iboténico, provoca una deficiencia en el aprendizaje y en la resolución del laberinto acuático de Morris en la rata (Silva y cols, 1998a).

El estudio de HM facilitó además de la distinción entre la memoria explícita e implícita, conocer las estructuras que las regulan. Milner, pensaba que los pacientes sin lóbulo medial temporal serían incapaces de adquirir cualquier tipo de memoria. Sin embargo, encontró que podían aprender cierto tipo de pruebas y retener este aprendizaje tanto tiempo como los sujetos controles (Milner, 1995; Milner y cols 1998). Lo cual sugirió que ciertos tipos de memoria podían estar regulados por otras estructuras. Squire y cols, encontraron que HM y otros pacientes con lesiones en el lóbulo medial temporal, tenían además de habilidades motoras intactas, capacidad de aprendizaje de tipo reflejo, como habituación y sensibilización; condicionamiento clásico, condicionamiento operante y “priming”, es decir su memoria de tipo implícita permaneció intacta (Squire y cols, 2004).



Lo anterior sugería entonces que este tipo de memoria se regula por estructuras fuera del lóbulo medial temporal. Aunque no existen evidencias de sujetos con deficiencias de memoria implícita asociadas a un daño cerebral particular, se sabe que la regulación de este tipo de memoria involucra diversas regiones cerebrales (Squire, 1987; Milner, 1995; Milner y cols 1998). Por ejemplo, se ha sugerido que la amígdala es importante para la memoria de estímulos emocionalmente significativos (LaLumiere y cols, 2003). Es decir, aquel tipo de aprendizaje relacionado con sensaciones placenteras (reforzador, como un sabor agradable) o no placenteras (castigo, como choques eléctricos). Se ha reportado que la estimulación eléctrica de la amígdala produce efectos amnésicos en monos, cuando se aplican inmediatamente después del aprendizaje de tareas aversivas; es decir interfiere con la consolidación de este tipo de memoria (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001). Algunas formas de condicionamiento aversivo, como aquel que es producido mediante estímulos dolorosos, como los choques eléctricos administrados en asociación a un estímulo auditivo, son procesadas en ésta estructura. Se ha reportado que las lesiones en la amígdala antes del entrenamiento previenen el desarrollo del condicionamiento aversivo, mientras que las lesiones post-entrenamiento deterioran la evocación del mismo, aun después de que las ratas han sido sometidas a sobreentrenamiento (Thompson y Kim, 1996; Rolls, 2000).

La corteza prefrontal juega un papel importante en el razonamiento y planeación, procesos que incluyen mantener, manipular y utilizar representaciones mentales que constituyen la memoria trabajando (Levy y Goldman-Rakic 2000). La corteza prefrontal



es una estructura crítica para la evocación de la memoria de corto plazo. Los sujetos que han sufrido un daño en esta área tienen problemas para recordar cualquier evento experimentado poco tiempo antes de la lesión, aunque este sea altamente significativo (Ambroggi y cols, 1999; Rolls, 2000). Adicionalmente, se ha demostrado que la corteza prefrontal de humanos, primates y la corteza medial frontal de roedores, está involucrada con el almacenamiento y evocación de la información temporal. Los humanos y monos lesionados en esta zona son incapaces de recordar el orden temporal en el que se les presenta cierta información, no pueden realizar actividades en forma ordenada (Levy y Goldman-Rakic, 2000, Owen, 2000).

Se ha propuesto que la corteza insular está relacionada con la memoria espacial. Mediante un estudio de tomografía por emisión de positrones (PET), se observó que mientras los sujetos recordaban la manera de desplazarse de un lugar conocido a otro, tanto la corteza insular como el hipocampo, mostraban mayor actividad, lo cual sugiere que ambas estructuras están relacionadas con este tipo de memoria. Los animales con lesiones en la corteza insular son incapaces de aprender o recordar tareas en laberintos espaciales (Bermúdez-Rattoni, 2001).

A la corteza insular, también se le ha llamado corteza gustativa o visceral, ya que recibe del tálamo ambos tipos de información. Las conexiones anatómicas de la corteza insular (amígdala, núcleo dorsomedial talámico y corteza prefrontal) sugieren que desempeña una función integral en la regulación de las reacciones viscerales y el procesamiento de la memoria. Se ha demostrado que la corteza insular participa en los



aspectos asociativos de las respuestas gustativas con estímulos viscerales (condicionamiento aversivo al sabor, CAS); como ocurre por ejemplo asociar un sabor novedoso, como la sacarina con un malestar estomacal provocado por la administración intraperitoneal de cloruro de litio. Las lesiones de la corteza insular impiden la adquisición del CAS; es decir los animales lesionados no muestran ninguna aversión al alimento condicionado (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991, Gallo y cols; 1992).

Los pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson, caracterizada por la degeneración de los ganglios de la base (sustancia negra pars compacta, núcleos putámen y caudado) tienen deficiencias en el aprendizaje motor (La Force y Doyon, 2001). La actividad neuronal del núcleo caudado en los monos esta relacionada con la ejecución de tareas instrumentales que involucra el movimiento de brazos o manos para alcanzar un reforzador (comida) y la estimulación eléctrica del mismo provoca la desorganización de secuencias motoras complejas, requeridas para realizar tareas finas (Cromwell y cols, 2005). Se ha reportado que lesionar el núcleo caudado de ratas les provoca alteraciones en la localización egocéntrica. Es decir, estos sujetos no pueden discriminar la dirección derecha o izquierda al resolver laberintos radiales donde deben encontrar un reforzador (White, 1997). La inactivación temporal, inducida por anestésicos locales, así como las lesiones electrolíticas o neurotóxicas permanentes, del núcleo caudado, deterioran la consolidación de la memoria en la prueba de la prevención pasiva en ratas (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989).



Adicionalmente, el aprendizaje y la memoria no ocurren en forma aislada de otros procesos. Lo que recordamos y cómo lo recordamos depende de diversos factores como el nivel de vigilia o alerta al momento del aprendizaje (Lapiz y Morilak; 2006). Diversos estudios han sugerido que el locus coeruleus (LC) participa en la regulación de diversas conductas a través de dos niveles básicos de acción. Primero, contribuye a la iniciación y mantenimiento de conductas y actividad cerebral apropiadas para la recolección de información sensorial, por ejemplo la vigilia. Segundo, dentro del estado de vigilia modula la selección y procesamiento de información sensorial relevante (Berridge y Waterhouse; 2003)

Este sistema de modulación es importante en la expresión de los ritmos diurnos, como el ciclo sueño-vigilia. Se ha descrito que la actividad tónica de este núcleo varía en relación al estado de alerta, mostrando una mayor actividad neuronal durante la vigilia, la cual disminuye durante el sueño de ondas lentas (SOL) y prácticamente desaparece durante el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR); y puede ser fásicamente activado por estímulos auditivos, visuales y táctiles (Aston-Jons y cols; 1999, 2005).

Por otro lado, se ha reportado que las neuronas del LC se activan en asociación a respuestas de orientación. En ratas y monos, la actividad de estas neuronas se incrementa durante la conducta de orientación espontánea o evocada por diferentes estímulos ambientales. Se ha reportado que durante la vigilia la actividad media y alta del LC están asociadas a la calidad de la ejecución en la resolución de tareas de



discriminación visual. Cuando la actividad del LC es intermedia los monos ejecutan mejor estas tareas, cometen menos errores, comparado con el momento en que el LC tiene mayor actividad. Por lo tanto, se ha especulado que, cuando el LC tiene una actividad elevada el sujeto no puede atender eficientemente a un estímulo; mientras que la alta eficiencia (mejor ejecución) se asocia con la actividad intermedia del LC. Se ha sugerido que la disfunción del LC contribuye al desorden cognoscitivo asociado a algunas enfermedades psiquiátricas. Como por ejemplo, en el síndrome de hiperactividad con déficit de atención (Berridge y Waterhouse; 2003). De tal forma que los procesos cognoscitivos requieren que el organismo tenga ciertas condiciones de vigila o alerta que facilitan el aprendizaje.



## **1.4 Fenómenos moleculares de los procesos cognitivos**

### **1.4.1. Neuroquímica**

Numerosos estudios han descrito la participación de diversas sustancias en la modulación de la memoria; de tal forma que neurotransmisores como acetilcolina (ACh), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), aminoácidos como glutamato (GLU), ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y péptidos como somatostatina (SST), orexina (ORX) cumplen una función importante en la regulación de los procesos de la memoria.

Acetilcolina (ACh): El sistema colinérgico ha sido ampliamente asociado a las funciones cognoscitivas (Giovannini y cols, 2005; Shinoe y cols, 2005). Desde el siglo pasado diversos autores han estudiado el efecto de la administración de un antagonista irreversible de la acetilcolinesterasa, di-isopropil fluorofosfato (DFP), la enzima que degrada a la acetilcolina, sobre el aprendizaje y la memoria en ratas (Lerer y cols, 1984). Posteriormente diversos grupos de investigación analizaron el efecto de antagonistas (atropina y escopolamina) colinérgicos sobre la memoria. Estos reportes sugirieron que el incremento en la función colinérgica cerebral favorece los procesos cognoscitivos, mientras que el decremento de la misma los deteriora (Prado-Alcalá y cols, 1995; Gold, 2003; Giovannini y cols, 2005).

El incremento de la acetilcolina hipocampal y cortical, después de la experiencia del aprendizaje en la rata, sugiere que este neurotransmisor es importante para la consolidación de la memoria (Myhrer, 2003). De hecho, se ha observado que la



activación post-entrenamiento de los receptores muscarínicos (mRs) en el hipocampo, el estriado y la amígdala de la rata, favorece la consolidación de la memoria, cuando esta es evaluada empleando el paradigma de prevención pasiva (Power y cols, 2003). La administración estriatal post-entrenamiento de antagonistas colinérgicos impide la consolidación de la memoria en la rata, con la prueba de prevención pasiva (Roldan y cols, 1997; Power y cols, 2003). Se ha reportado que la administración de escopolamina favorece la recuperación de las conductas como la solución de la prevención pasiva, cuando es administrada después de la extinción (Roldan y cols, 2001). Adicionalmente se ha sugerido que la acetilcolina es importante para el aprendizaje de los estímulos emocionalmente significativos. Pare (2003) ha reportado que la administración de antagonistas muscarínicos en la amígdala basolateral reduce la retención de la memoria. Posiblemente el sistema colinérgico ha sido uno de los más estudiados tratando de entender los mecanismos del aprendizaje y la memoria, sin embargo se ha demostrado que este sistema de neurotransmisor no es el único que regula de los procesos cognoscitivos.

Catecolaminas: noradrenalina (NA) y dopamina (DA). No obstante la relevancia del sistema colinérgico en los procesos cognoscitivos, los sistemas catecolaminérgicos, también participan en la regulación de dichos procesos (Myhrer, 2003; Gordon y Bains, 2006). El sistema noradrenérgico (Lapiz y Morilak, 2006) es un regulador de procesos cognoscitivos como alerta, atención, aprendizaje y memoria. Las infusiones post-entrenamiento de agonistas y antagonistas noradrenérgicos en la amígdala basolateral afectan la consolidación de la memoria en diversas pruebas (Liao y cols, 2002). Por





ejemplo, la administración intra amígdala de noradrenalina mejora la consolidación en el condicionamiento aversivo contextual (LaLumiere, 2003).

Por otro lado, Liao y cols (2002) han estudiado el efecto de la administración de diversos antagonistas dopaminérgicos y noradrenérgicos sobre la memoria espacial de la rata, encontrando que el número de errores y el tiempo total de ejecución se incrementa al resolver el laberinto radial. Por lo tanto sugieren que los receptores D1 y D2, así como los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son importantes para la expresión de la memoria espacial. Se ha sugerido que la dopamina es un regulador importante en los cambios sinápticos específicos observados durante el aprendizaje y la memoria, mediados por la activación de la vía intracelular AMPc-PKA (Jay, 2003). Recientemente se ha descrito mediante la tomografía por emisión de positrones la relación de la función dopaminérgica y los procesos cognoscitivos humanos. La actividad de la DA de la corteza frontal modula los procesos cognoscitivos de tipo ejecutivo como la memoria trabajando y la atención; mientras que las alteraciones del circuito estriatal talámico dopaminérgico son responsables del deteriora cognoscitivo observado en las enfermedades de parkinson, esquizofrenia y durante el envejecimiento (Cropley y cols, 2006).

Serotonina (5HT): El receptor tipo 4 de serotonina (5-HT<sub>4</sub>) se encuentra localizado predominantemente en estructuras neuroanatómicas relacionadas con los procesos cognoscitivos. Sin embargo, pocos experimentos han reportado que la administración sistémica aguda de agonistas selectivos de este receptor mejore la



ejecución en diversas pruebas de memoria y que este efecto sea revertido por la administración simultánea de antagonistas 5HT<sub>4</sub> (Meneses, 2001). Orsetti y cols (Orsetti y cols 2003) han demostrado que la administración del agonista parcial RS67333 del receptor 5HT<sub>4</sub> en el núcleo basal magnocelular (NBM), mejora la adquisición y la consolidación, pero no la evocación, de la memoria de reconocimiento de lugar, en ratas. El uso de MDMA (ecstasy) en humanos se ha asociado con la decadencia de las funciones cognitivas y se ha postulado que el deterioro de las terminales serotoninérgicas afecta el funcionamiento del hipocampo (Sprague y cols, 2003, Reneman y cols, 2006).

En ratas, se ha observado que el tratamiento por 7 días con MDMA disminuye (34%) los niveles de 5HT hipocámpal y deteriora la memoria espacial, evaluada en el laberinto acuático de Morris (Schroder y cols, 2003). Por otro lado, evidencias preclínicas recientes han demostrado que los inhibidores de la recaptura de serotonina promueven la neurogénesis, ya que revierten el efecto de atrofia hipocámpal inducido por el estrés y mejoran los procesos cognitivos (Schmitt y cols 2006). La administración crónica de meta-anfetamina (mAMPH) produce un efecto neurotóxico en las terminales serotoninérgicas. Este efecto está asociado al deterioro en la memoria de reconocimiento (diferenciar objetos novedosos) de corto y largo plazo (Sprague y cols, 2003). Mientras la administración aguda de mAMPH provoca un déficit en la memoria no espacial dependiente del hipocampo. Adicionalmente, se ha observado que los sujetos sometidos al tratamiento de largo plazo (9 a 12 meses) con paroxetina (fármaco inhibidor de la recaptura de la serotonina utilizado para la depresión), mejoran su



memoria declarativa y el volumen hipocampal medido con imagen de resonancia magnética se incrementa un 4.6 % (Vermetten y cols, 2003). El estudio del sistema serotoninérgico en los procesos cognoscitivos permite proponerlo ya para el tratamiento de disfunciones del aprendizaje y la memoria.

Glutamato (GLU): El aminoácido excitatorio GLU, participa importantemente en los procesos cognoscitivos. Se ha encontrado que la administración de L-glutamato intrahipocampal post-entrenamiento, favorece la retención en el laberinto en "T"; mientras que la administración de MK801, un antagonista no competitivo del receptor NMDA, daña la retención en el mismo modelo (Farr y cols, 2000). Se ha observado también que la administración intra-acumbens e hipocampal (CA1) del agonista glutamatérgico NMDA, deteriora la ejecución en una prueba de condicionamiento clásico aversivo, solo cuando es administrada inmediatamente después del entrenamiento y no afecta la evocación de la misma (De Leonibus y cols, 2003 y Roesler y cols, 2006). Por otro lado, Salinska y Stafiel (2003) han demostrado que los receptores glutamatérgicos metabotrópicos de tipo I y II, además de estar involucrados en los procesos celulares de la potenciación de largo plazo (LTP, un modelo electrofisiológico de memoria), también participan en el aprendizaje y en la formación de la memoria. La administración de los agonistas ACDP y ABHxD-1 del receptor mGLU inhibe la formación de la memoria cuando son administrados después del entrenamiento en la prueba de prevención (Salinska y Stafiel, 2003). Adicionalmente, Barros y cols. (2000 y 2003) han demostrado que la evocación de la prueba de la prevención pasiva requiere de la activación de los receptores de GLU en el hipocampo



y en las cortezas, entorrinal, prefrontal y del cíngulo. Estos resultados sugieren la importancia de la regulación del sistema excitatorio en el aprendizaje y la memoria.

Ácido gama-amino butírico (GABA): Uno de los sistemas inhibitorios involucrados en la regulación de los procesos cognoscitivos es el sistema GABAérgico. En el estriado, este aminoácido es importante para la consolidación de la memoria; se ha reportado que antagonistas GABAérgicos (picrotoxina y bicuculina) administrados inmediatamente después del entrenamiento, deterioran la consolidación de la memoria relacionada a estímulos aversivos (Salado-Castillo y cols, 1996). Por otro lado, se ha observado que las ratas tratadas con bicuculina después de que han sido entrenadas para resolver el laberinto en "T", mejoran su retención (Farr y cols, 2000). Posiblemente el efecto bifásico de estos agonistas gabaérgicos sobre la memoria es dosis dependiente.

Recientemente se ha demostrado que la administración de algunos agonistas selectivos del receptor GABA(A), el cual se distribuye preferentemente en el hipocampo, facilita la memoria, ya que después de la administración de estos agonistas, las ratas resuelven mas eficientemente modelos espaciales como el laberinto acuático (Maubach, 2003, Collinson y cols 2006). Estos resultados involucran al sistema GABAérgico en la regulación de los procesos cognoscitivos.

Neuropéptidos: Diversos estudios han demostrado que los procesos cognoscitivos son regulados importantemente por una gran variedad de neuropéptidos.



Por ejemplo, la somatostatina (SST) que está involucrada en una gran variedad de funciones fisiológicas, a través de la activación de sus receptores (sst1-sst5) (Reisine y Bell, 1995). El receptor sst2 se encuentra ampliamente expresado en la corteza cerebral y el hipocampo, y se ha asociado a la regulación de los procesos cognoscitivos. Dutar y cols (2002) han reportado que los ratones knock-out del receptor sst2 aprenden mas eficientemente las tareas de discriminación espacial utilizando el laberinto radial, comparados con sus controles; mientras que el aprendizaje operante en estos mismos ratones se encuentra deteriorado. Por otro lado, se ha reportado que la administración de cisteamina, una sustancia que depleta reversiblemente los niveles de SST, produce un merma en la ejecución del laberinto acuático de Morris (Justino y cols, 1997). Sin embargo, Guillou y cols han demostrado que la SST tiene un papel bidireccional en los procesos cognitivos, ya que la depleción de este péptido, inhibe la adquisición de pruebas espaciales y facilita la adquisición de pruebas de palanqueo (Guillou y cols, 1998, 1999); mientras que la administración de SST facilita la adquisición de tareas espaciales en el ratón (Lamirault, 2001). Recientemente se ha demostrado que la administración ip de FK962 un fármaco que facilita la liberación de SST, mejora la memoria espacial de ratas envejecidas al resolver el laberinto acuático de Morris (Tokita y cols, 2005). Estos resultados sugieren que la SST es un candidato facilitador de la memoria dependiente del hipocampo.

Orexina (ORX): La ORX es un péptido producido por las neuronas hipotálamicas sensibles a la glucosa y sus receptores están distribuidos ampliamente a través del cerebro (Wu y cols, 2002). Por ejemplo en el hipocampo existe una amplia distribución



del receptor 1 para ORX. Se ha observado que la administración post-entrenamiento de ORX mejora la retención en las pruebas de prevención activa y pasiva en ratones (Jaeger y cols, 2002), mientras que en la rata, la administración de ORX retarda el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. Este efecto se ha asociado a la supresión de la LTP en las colaterales de Schaffer-CA1 provocada por la superfusión de ORX en rebanadas de hipocampo (Aou y cols, 2003). Sin embargo, recientemente se ha reportado que la administración del antagonista del receptor a ORX SB334867-A deteriora la adquisición, consolidación y evocación de la memoria espacial en la rata, en el laberinto acuático de Morris, estos resultados le atribuyen un papel importante a la ORX endógena en los procesos cognoscitivos (Akbari y cols, 2006).

Opioides endógenos: El sistema de péptidos opioides (endorfinas y encefalinas) se ha asociado a los procesos cognoscitivos con resultados controvertidos. Por ejemplo, se ha reportado que la administración intrahipocampal de naloxona, un antagonista opioide, a ratas envejecidas que muestran deteriorados los procesos cognoscitivos, facilita la formación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y prolonga el mantenimiento del modelo electrofisiológico de memoria LTP (long term potentiation, potenciación de largo plazo), así como del EPSP (excitatory post-synaptic potentials, potenciales post-sinápticos excitatorios), y sugieren que la naloxona mejora el aprendizaje y la memoria de las ratas envejecidas a través del fortalecimiento sináptico (Zaho y cols, 2004). Adicionalmente se ha demostrado que la depleción de la morfina endógena (endorfina) mediante la administración de una IgG anti-morfina a ratones, revierte el déficit de memoria generado por estrés (privación de alimento) en la



prueba de prevención pasiva (Guarna y cols, 2005). Estos resultados sugieren que la liberación de la morfina endógena durante un evento estresante es responsable del debilitamiento de la memoria que ocurre en dichas condiciones, probablemente este sistema está relacionado con el manejo del estrés. Sin embargo, se ha reportado también que la dinorfina y otros agonistas kapa opioides revierten el deterioro de la memoria inducido por el bloqueo de la transmisión colinérgica (Hiramatsu y Watanabe, 2006) y por la exposición a CO<sub>2</sub> (Hiramatsu e Inoe, 2000). Recientemente se ha descrito que el efecto de dinorfina sobre la memoria no es revertido mediante la administración de antagonistas del receptor kapa opioide, lo cual sugiere, que el efecto de este péptido sobre la memoria no ocurre únicamente a través de receptores a opioides (Hiramatsu e Inoue, 2000; Hiramatsu y Watanabe, 2006). Los diferentes efectos de los péptidos opioides no permiten esclarecer su papel en los procesos cognoscitivos, la realización de más experimentos es necesaria para esclarecer su función.

Endocannabinoides: Otro de los sistemas que se ha involucrado en la modulación de los procesos cognoscitivos es el sistema de los cannabinoides endógenos. Por ejemplo, se ha reportado que la administración de anandamida (análogo endógeno del principio activo de la marihuana,  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinol) deteriora la consolidación de la memoria de la rata (Murillo-Rodríguez y cols, 2001). Mientras que la administración del antagonista del receptor para cannabinoides CB1, el SR141716A, mejora la ejecución de las ratas en diversas pruebas de memoria (Wolf y Leander, 2003; Wotjak, 2005). Contradictoriamente se ha reportado que la administración del antagonista AM251 a rebanadas de cerebro de rata inhibe la inducción del LTP hipocampal (de



Oliveira y cols, 2006) y deteriora la evocación de la memoria en la rata en la prueba de prevención pasiva, pero no afecta la ejecución de la rata en la prueba de campo abierto (de Oliveira y cols, 2005). Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha demostrado (datos no publicados), que la administración sistémica y estriatal de anandamida afecta la expresión de la estrategia utilizada por la rata para resolver el laberinto de Barnes dependiendo del ciclo luz-oscuridad. Mientras que la administración hipocampal de anandamida deteriora la expresión de la memoria espacial y este efecto puede ser prevenido por la administración del antagonista del receptor CB1 AM251 (Rueda-Orozco y cols, artículo en preparación). Adicionalmente se ha demostrado que la anandamida y la oleamida afectan la expresión de los potenciales evocados relacionados a eventos (Rueda-Orozco y cols, artículo en preparación). Estos resultados apoyan el papel de los endocannabinoides en la regulación de los procesos cognoscitivos.

Con todo, el conocimiento sobre la neuroquímica de la memoria aún está incompleto. Proteínas y péptidos que afectan estos procesos siguen describiéndose. Por ejemplo, recientemente, se descubrió un neuropéptido, al cual llamaron cortistatina (CST), en función a su semejanza estructural con la somatostatina (SMT) y por la distribución cerebral cortical de su RNAm (de Lecea y cols, 1996). Este grupo de investigadores reportó que la CST modula la actividad neuronal de la corteza cerebral e hipocampo, sugiriendo que puede afectar el aprendizaje y la memoria.





### 1.4.2. La Cortistatina

En 1996, de Lecea y cols. clonaron una proteína de 112 aminoácidos (aa) a partir de una biblioteca de DNA complementario de células de hipocampo, a la que denominaron precortistatina. Esta proteína muestra una alta homología con preprosomatostatina (116 aa), principalmente en la región carboxiterminal (Figura 3a). Estas moléculas son precursoras de los péptidos CST-14 y SST-14 respectivamente y como podemos observar en la Figura 3b, comparten 11 de los 14 aa que las componen. Incluso CST tiene la secuencia de aa que utiliza SST para unirse a sus receptores Phe-Trp-Lys-Thr (de Lecea y cols, 1996, 1997; Criado y cols, 1999; Spier y de Lecea, 2000). Se ha reportado que CST se une con alta afinidad (nmolar) a los 5 subtipos de receptores para SST (SST1-SST5) expresados en células CCL39 (Chinese hamsters lung fibroblast cells; Siehler y cols 1998). Por otro lado, Connor y cols en 1997 reportaron que la CST es un agonista de los receptores SST2 en neuronas del locus coeruleus (LC), ya que provoca la hiperpolización de dichas neuronas.

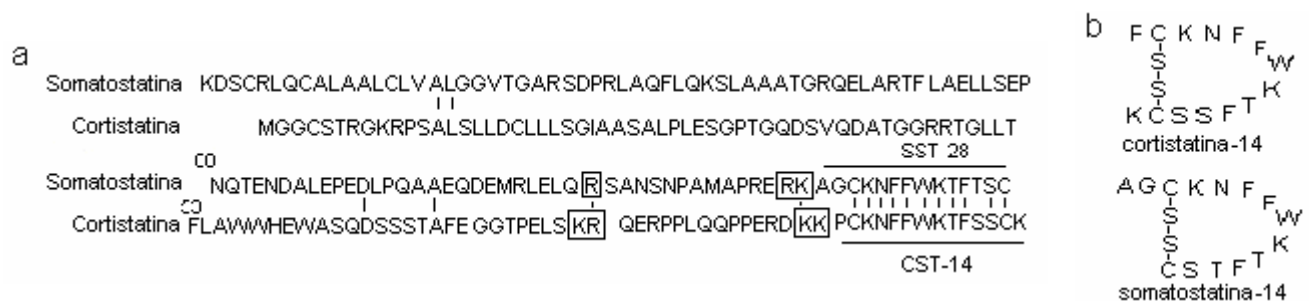


Figura 3 Dibujo de la estructura de la CST. En a se muestra la estructura lineal de los precursores, precortistatina y preprosomatostaina, los corchetes señalan la región carboxiterminal. b muestra la estructura de los péptidos cortistatina-14 y somatostatina-14. Modificado de de Lecea 1996.



Recientemente se ha reportado que un receptor “huérfano” llamado MrgX2, el cual está acoplado a una proteína g (Pg), podría ser un receptor específico para la CST, ya que se une a éste con alta afinidad en células de los ganglios de la raíz dorsal en humanos. Estudios de inmunohistoquímica en muestras de tejido de humano sugieren la existencia de este receptor en hipocampo (específicamente en CA2, CA3, CA4) sustancia negra e hipotálamo, así como la coexistencia del receptor y el péptido en los ganglios de la raíz dorsal, testículos y páncreas (Robas y cols, 2003).

Estimaciones del RNAm de precortistatina sugieren que es exclusivo de tejido cerebral, ya que no se encontró en glándulas adrenales, hígado, bazo, timo, ovario testículos o pituitaria anterior en tejido de rata (de Lecea y cols, 1996). La identificación de la distribución celular del RNAm de CST por medio de hibridación “*in situ*” en cortes de cerebro de rata, muestra una expresión característica en corteza cerebral e hipocampo, particularmente CA1 y CA3 (Figura 4). En estas regiones coexiste con la GAD67, enzima involucrada en la síntesis de GABA, lo que sugiere que el RNAm de la CST se encuentra en interneuronas GABAérgicas (de Lecea y cols, 1996, 1997; Spier y de Lecea, 2000)

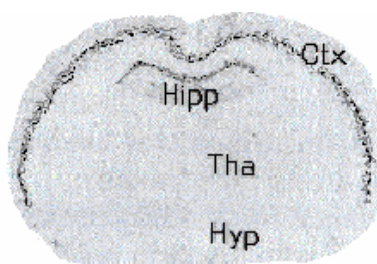
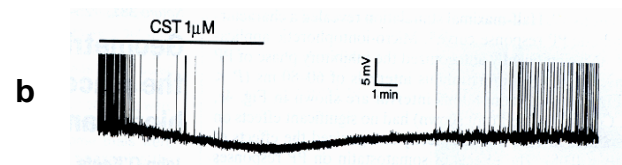
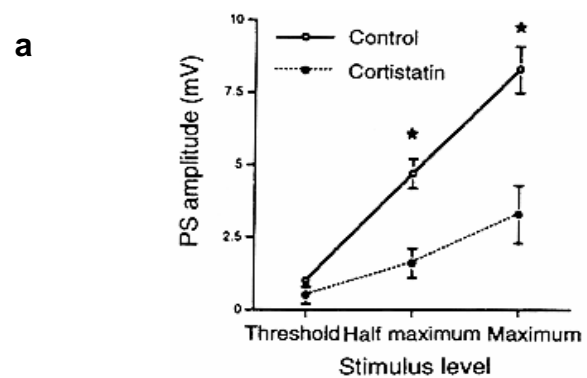


Figura. 4 Hibridación *in situ* del RNAm del precursor de la CST.



El estudio del efecto de la CST sobre la electrofisiología del hipocampo ha demostrado que este péptido produce una disminución de la amplitud de la espiga poblacional evocada en CA1 (Figura 5a). Adicionalmente, en registros intracelulares de neuronas de CA1, mediante la técnica de anclaje de corriente, se ha demostrado que la superfusión de  $1\mu\text{M}$  de CST provoca la abolición de los potenciales de acción, la hiperpolarización asociada a la disminución de la frecuencia de disparo alcanza su máximo a los 7 minutos (de Lecea y cols, 1996) (Figura 5b).

Figura 5 Efecto de la CST sobre la electrofisiología del Hipocampo. En a) observamos la disminución (\*) de la amplitud de la espiga poblacional provocada por la administración de  $1\mu\text{M}$  de CST, a dos intensidades de estimulación y en b) se puede observar la disminución de la frecuencia de disparo asociada a la hiperpolarización de las neuronas de CA1, provocada la superfusión de la misma dosis de la CST.



El estudio del efecto de la CST sobre el otro grupo neuronal (corteza cerebral) en el cual se expresa su RNAm ha sugerido que la administración intracerebroventricular (icv) de la CST también afecta la excitabilidad cortical. El registro electroencefalográfico de ratas tratadas con la CST muestra un incremento en las ondas lentas corticales. Por otro lado, se ha observado que la CST inhibe la actividad de las neuronas del LC,



núcleo noradrenérgico involucrado en la regulación de diversas funciones, como el sueño y los estados de alerta (Connor, 1997). De hecho, se ha observado que la infusión icv de la CST provoca un incremento en el sueño de ondas lentas en ratas (de Lecea, 1996).

Se ha reportado que la CST interacciona con el neurotransmisor ACh (de Lecea, 1996). También se ha sugerido que este neurotransmisor participa en la regulación de los procesos cognoscitivos. En la corteza cerebral y el hipocampo, la administración de CST antagoniza el efecto excitatorio de la ACh. La CST inhibe la desincronización del electroencefalograma inducida por ACh (Figura 6a); y en el hipocampo provoca la inhibición de la expresión de la espiga poblacional evocada mediante el paradigma de pulsos pareados inducida por ACh (Figura 6b) (de Lecea y cols, 1996, 1997; Spier y de Lecea, 2000).

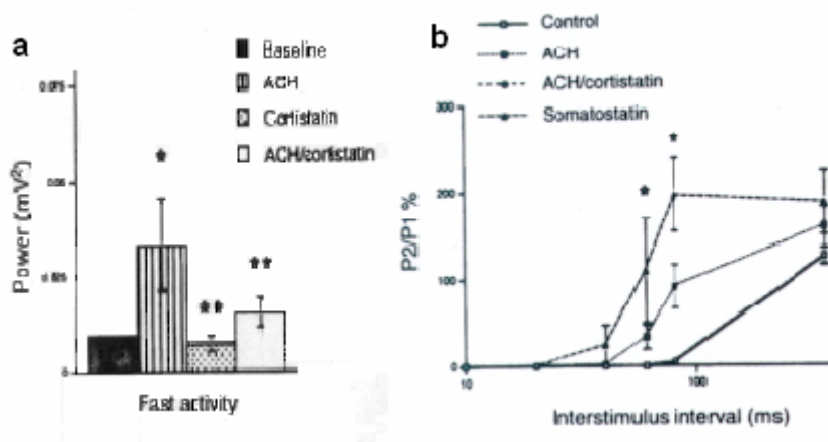


Figura 6 Interacción CST-Acetilcolina. En a se observa el efecto inhibitorio sobre la desincronización del EEG, inducida por ACh. Mientras que en b observamos la inhibición de la expresión de la espiga población evocada.



La administración de CST no sólo afecta el comportamiento electrofisiológico de las neuronas del hipocampo, sino también los procesos mnemónicos relacionados con dicha estructura. Por ejemplo, se ha demostrado que la CST interfiere con la consolidación de la memoria en el ratón (Flood y cols, 1997) y en la rata (Sánchez-Alavez y cols, 2000); de la misma forma se ha reportado que la CST también afecta la evocación de la memoria en ratas (Sánchez-Alavez y cols, 2000). Recientemente se ha demostrado que los ratones transgénicos que sobre-expresan CST generan un LTP hipocampal de menor amplitud comparado con sus controles y tienen deteriorado el aprendizaje espacial en la prueba del laberinto de Barnes (Tallent y cols, 2005).

Posiblemente el efecto de la CST sobre el sueño y la memoria se deba al efecto inhibitorio que produce sobre las neuronas de la corteza y el hipocampo, a través de la interacción con un receptor propio o para SST. Obviamente, el efecto de la CST sobre sistemas de neurotransmisión, como el colinérgico, GABAérgico o noradrenérgico dependerá de que las células de estos sistemas posean el receptor a CST. Cabe mencionar que estos sistemas de neurotransmisión están involucrados en la regulación de otras funciones como la analgesia y la temperatura y conductas como la ingesta de alimento, lo cual abre la posibilidad de la CST afecte a través de la interacción con estas sustancias dichas conductas y funciones.



### 1.4.2 Bases genéticas de la memoria

El estudio de la memoria ha revelado que los procesos cognoscitivos no sólo son regulados a nivel extracelular, una gran variedad de sustancias, que forman parte de cascadas de señalización intracelular participan también en la regulación de los procesos cognoscitivos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la característica mas importante del sistema nervioso central es su capacidad de adquirir, almacenar y evocar información y uno de los retos de las neurociencias ha sido describir dichos mecanismos. A principios del siglo pasado Santiago Ramón y Cajal (1894) estableció que el SNC estaba hecho de unidades discretas (neuronas) que interactuaban entre sí. Esta propuesta llevó a Ramón y Cajal y a otros neurocientíficos a sugerir que ésta interacción podía sufrir modificaciones durante el desarrollo de algunos procesos, como la memoria. Posteriormente, Hebb (1949) propuso que la actividad coincidente de dos neuronas conectadas (sinapsis) provoca el fortalecimiento de su conexión. Ambas propuestas nos sugieren entonces que durante el proceso de la memoria ocurren cambios en la sinapsis (Figura 7) (Squire, 1987; Schaffe y cols, 1999).

Actualmente, existen evidencias que sugieren que este fortalecimiento sináptico es consecuencia de la síntesis de proteínas que ocurre durante la consolidación de la memoria. Por ejemplo, se ha demostrado que la consolidación de la memoria puede ser bloqueada con inhibidores de la síntesis de proteínas y de la síntesis de RNAm, ya sea



inhibidores de la transcripción o traducción (pasos que ocurren durante la síntesis de proteínas); lo cual sugiere que este proceso de la memoria requiere de la síntesis de *novo* de proteínas (Cammarota, 2003, Wagatsuma y cols 2006). Las proteínas sintetizadas durante el proceso de la memorización pueden contribuir a la reestructuración de la sinapsis y mejorar la eficiencia sináptica.

Los eventos relacionados a los procesos cognoscitivos y su relación con la expresión de genes en neuronas no son bien conocidos, pero Kandel y cols. (2000), han propuesto un esquema. Ellos sugieren que el primer paso de los eventos intracelulares durante el proceso de aprendizaje es la unión del ion  $Ca^{2+}$  a la calmodulina, el cual activa a la adenilato ciclasa, promoviendo por lo tanto la síntesis de AMPc.

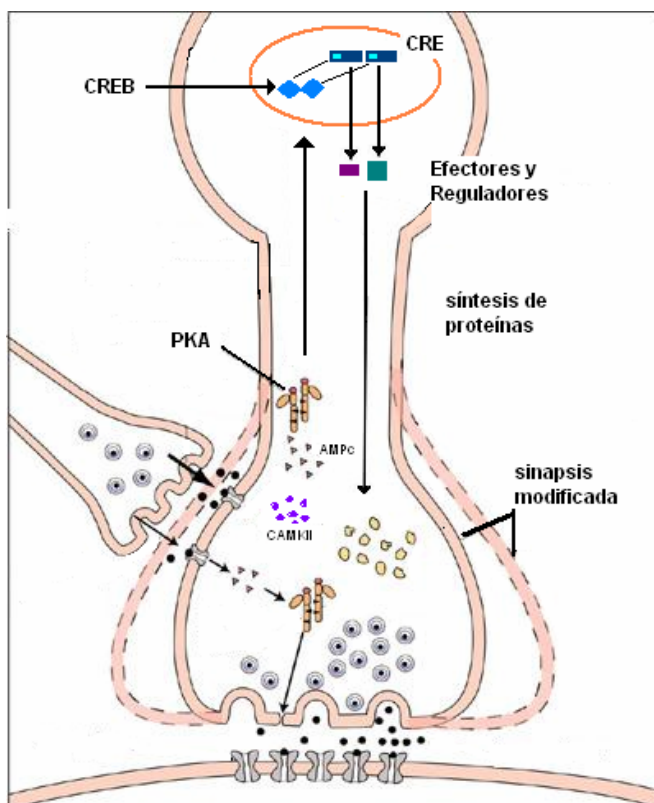


Figura 7. Eventos intracelulares relacionados a los procesos cognoscitivos. En este dibujo se ilustra la cascada de señalización involucrada en la formación de la memoria, a partir de la activación de la CAMK II (calmodulina cinasa II), AMPc (adenosina monofosfato cíclico), PKA (proteína cinasa A), CREB (proteína que se une al elemento de respuesta del AMPc) y genes efectores que regulan la producción de proteínas involucradas en formación de nuevas sinapsis, por ejemplo el BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro).



El incremento en la concentración de AMPc dispara la activación de PKA (proteína cinasa A), la cual puede finalmente translocarse al núcleo. Una vez en el núcleo la PKA, activa a CREB (cAMP-responsive element-binding proteins, proteína que se une al elemento de respuesta del AMPc), el cual inicia la transcripción temprana de genes tales como *c-fos* o *c-jun*. Estos genes de expresión temprana pueden iniciar la transcripción de genes de expresión tardía, los cuales codifican para la síntesis de proteínas importantes para la memoria, por ejemplo las proteínas involucradas en los cambios estructurales de las sinapsis (factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF) (Kandel y cols; 2000; Takeo, 2003; Waltereit; 2003; Radecki y cols, 2005) (Figura 7). La modificación de la expresión de esta cascada de señalización afecta la memoria (Mansuy, 2004). Por ejemplo se ha reportado que las mutaciones que afectan la producción de AMPc, en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), les provoca un deterioro en la memoria olfativa (Mayford y Kandel, 1999). De la misma forma, la producción de una forma mutante de PKA, que no reconoce la subunidad catalítica del AMPc, deteriora la memoria olfativa en la *Drosophila*. Mientras que la activación de esta cascada, mejora la ejecución en diversos modelos conductuales de aprendizaje y memoria (Silva<sub>b</sub>, 1998; Sun y cols, 2006).

La infusión intrahipocampal de 8Br-cAMP o forskolina, ambos activadores de la adenilato ciclasa (enzima que sintetiza AMPc), favorece la consolidación de la memoria del aprendizaje aversivo en la rata (Bernabeu y cols, 1997). Se ha reportado también que la estimulación de AMPc hipocampal mediante la administración de forskolina





favorece el proceso de aprendizaje espacial en la rata utilizando el laberinto acuático de Morris (Martel y cols, 2006). Mientras que la administración de KT5720, un inhibidor específico de la PKA deteriora la consolidación de la memoria (Wallenstein y cols, 2002). Adicionalmente se ha reportado que la inmunoreactividad de la PKA y pCREB (la forma activa de CREB, o sea fosforilado) se incrementa en el hipocampo 3-6 horas después de que la rata ha sido entrenada a resolver un paradigma de memoria (Bernabeu y cols, 1997).

Sin embargo, diversas evidencias sugieren que los genes que regulan la síntesis de las sustancias involucradas en esta cascada de señalización, no son todos los implicados en la regulación de los procesos cognoscitivos. Recientemente, con la introducción de la técnica de los micro arreglos, la cual permite analizar de forma simultánea una gran cantidad de genes, se ha descrito la expresión diferencial de éstos en las estructuras cerebrales que regulan los procesos cognoscitivos (Letwin y cols, 2006). De esta forma, se ha descrito el perfil de expresión de los genes del hipocampo (Irwin, 2001; Cavallaro y cols, 2001; Luo y cols; 2001, Burger y cols, 2006) y amígdala (Dent y cols; 2001; Pape y Stork, 2003; Mei y cols, 2006), involucrados en la consolidación de la memoria en la rata y como estos genes cambian su expresión cuando los sujetos son sometidos a tratamientos farmacológicos que modifican su ejecución en paradigmas experimentales (Hsieh y cols, 2003; O'Donnell y cols, 2003).



## 1.5 Los ritmos biológicos de la memoria.

Si observamos un proceso fisiológico en cualquier ser vivo, durante un tiempo suficiente, podríamos concluir que su expresión no es constante, sino que tiene periodos de máxima actividad que alternan con periodos de mínima o nula actividad. También podríamos concluir que esta variación es rítmica y que se ajusta al momento más adecuado del entorno. Estos fenómenos se conocen como ritmos diurnos (Aguilar-Roblero y Escobar, 2000). Sin embargo, no sólo son regulados por el entorno, si no también por sincronizadores internos que les permite oscilar aun en ausencia de sincronizadores externos (Deurveilher y cols 2005). Estos ritmos son llamados endógenos y en el caso de los mamíferos uno de sus sincronizadores internos son los núcleos supraquiasmáticos (Aguilar-Roblero y cols, 1994). Animales y humanos expresan su fisiología como un ritmo. El fenómeno fisiológico que más evidentemente muestra su ritmicidad es el ciclo sueño-vigilia. Pero la ingesta de alimento, la temperatura corporal, la conducta motora, los procesos cognitivos, y otras funciones también presentan oscilaciones rítmicas a lo largo del día (Figura 8) (Folkard y Monk, 1979; Aguilar-Roblero y Escobar, 2000; Albrecht, y Oster, 2001, Dijk y von Schantz, 2006).

Se ha reportado que la eficiencia para resolver diversas tareas que involucran los procesos cognoscitivos muestra variaciones diurnas (Monk 1994; Monk y cols, 1997, Maheu y cols, 2006). Higuchi y cols. (2000) reportaron que la respuesta electrofisiológica relacionado a procesos cognoscitivos, llamado P300 (potencial



auditivo evocado que aparece 300 ms después del estímulo auditivo) muestra variaciones diurnas en humanos. La amplitud de la P300 es mayor a las 08:00 horas que a las 17:00 y 20:00. Mientras que la latencia de la P300 está positivamente correlacionada con la somnolencia y negativamente correlacionada con el nivel de atención de los sujetos. Por otro lado se ha reportado que la desorganización de los ritmos circadianos, consecuencia de cambios en el fotoperíodo daña la retención de la memoria, pero no los procesos de la adquisición (Antoniadis y cols, 2000), lo cual sugiere que existen tiempos específicos del día en los cuales el aprendizaje y la memoria se expresan mejor.

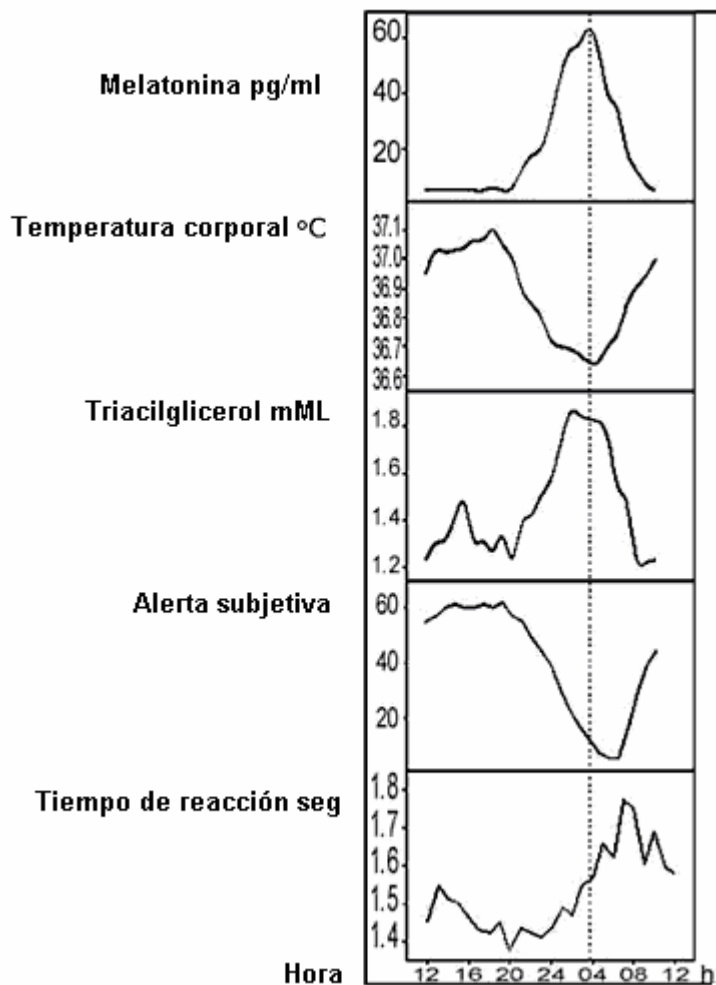


Figura 8. En esta figura se muestran las variaciones diurnas de algunos procesos fisiológicos, como la liberación de sustancias, la temperatura corporal y la alerta y tiempo de reacción relacionados a la ejecución de una tarea.



Recientemente Rönköping y cols (2005) reportaron que la inducción de genes de expresión temprana involucrados en la regulación de procesos cognoscitivos como NGF1 A y B, inducida en roedores colocados en medio ambiente enriquecido tiene variaciones diurnas. La inducción de estas moléculas es mayor durante la fase de oscuridad del fotoperíodo, cuando las ratas tienen mayor actividad locomotora y exploratoria. Estos resultados sugieren que también la inducción de genes esta sujeta a variaciones diurnas, y es importante tomarlo en cuenta para futuras investigaciones que involucren el análisis de la expresión de este tipo de mediadores celulares que regulan la actividad neuronal y por consiguiente los procesos cognoscitivos.



## II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que la CST afecta la consolidación y la evocación de la memoria. Sin embargo, no se ha estudiado si el efecto de la CST sobre la memoria tiene variaciones diurnas. El papel de la CST sobre los procesos cognoscitivos no está completamente descrito. De tal forma que este trabajo pretende responder si el efecto de la CST tiene variaciones diurnas; además de enriquecer el estudio del papel de la CST en la regulación de los procesos cognoscitivos.

Una meta adicional es estudiar si existe una interacción entre la CST y otros sistemas neuroquímicos que están involucrados en la regulación de otras conductas como el ciclo sueño-vigilia, la ingesta de alimento, la temperatura corporal y la analgesia.



### III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### Hipótesis

- El efecto de la CST exógena sobre la memoria y el aprendizaje espacial de la rata tiene variaciones diurnas.
- Si la CST interacciona con otros sistemas de neurotransmisión su administración afecta la regulación de la ingesta de alimento, la temperatura corporal y la analgesia.

#### Objetivos

1. Analizar las variaciones diurnas del efecto de la CST exógena sobre:
  - El aprendizaje y la evocación de la memoria espacial de la rata.
  - La actividad motora y el estado de alerta.
  - La concentración de AMPc y la expresión de genes
2. Analizar el efecto de la CST exógena sobre
  - La ingesta de alimento.
  - La temperatura corporal.
  - La percepción al dolor



#### IV MATERIAL Y METODO

Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron los siguientes experimentos:

- Análisis de las variaciones diurnas de la ejecución de la rata en el LB.
- Administración icv de la CST y analizar el efecto sobre la evocación de la memoria de la rata, utilizando el LB.
- Estudio de la evocación de la memoria de la rata en el LB bajo el efecto de la administración intrahipocampal de la CST.
- Administración icv de la CST y análisis del efecto sobre el aprendizaje espacial de la rata en el LB, 30 min y 240 min pos-administración.
- Efecto de la administración icv de la CST sobre la actividad motora de la rata, utilizando la viga de equilibrio de Drucker y el Rota Rod.
- Administración icv de la CST y análisis del efecto sobre el ciclo sueño-vigilia de la rata.
- Efecto de la CST sobre la concentración de AMPc en cultivo celular de hipocampo y puente.
- Análisis de la expresión de genes en el hipocampo y puente de la rata después de la administración de la CST, utilizando la técnica de los microarreglos.
- Efecto de la administración icv de la CST sobre la ingesta de alimento de la rata en dos puntos representativos del ciclo de luz-oscuridad-oscuridad.
- El efecto de la administración icv de la CST sobre la temperatura corporal de la rata.



- Efecto de la administración icv de la CST sobre la respuesta al dolor de la rata, empleando la prueba del “Hot Plate”.

Para todos los experimentos se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso de 250 a 350 g, acondicionadas a un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 (08:00 horas, hora de encendido), en condiciones de agua y alimento *ad libitum*.

*Memoria:* Las ratas empleadas en estos experimentos fueron sometidas a una cirugía estereotáxica para implantarles una cánula guía (1 cm y 23 g, de acero inoxidable) dirigida al ventrículo lateral derecho, (posterior 0.8, lateral 1.5 y vertical 3.8, respecto a bregma) o en su caso, un par de las mismas cánulas dirigidas a la región CA1 hipocampal (posterior 4, lateral 2.5 y vertical 2.2) (Paxinos y Watson, 1986) (Figura 9). La cirugía se realizó bajo anestesia general (halotano, 2-3%). Antes de cualquier manipulación las ratas tuvieron una semana de recuperación



Figura. 9. En esta figura observamos a una rata implantada con un juego de electrodos para registrar el electroencefalograma.





Todas las administraciones se realizaron a través de la o las cánulas guía, empleando una bomba de administración. Para la administración icv utilizamos una velocidad de  $1\mu\text{l}/\text{min}$  y para la administración intrahipocampal  $1\mu\text{l}/5\text{ min}$ .

*Laberinto de Barnes:* Esta prueba tiene como objetivo evaluar la memoria espacial y de trabajo (Barnes, 1979). El Laberinto de Barnes utilizado en estos experimentos consiste de un área circular de 125 cm de diámetro y 90 cm de altura. Tiene 40 agujeros de 6 cm de diámetro distribuidos en su periferia. De manera aleatoria en uno de ellos se instala un túnel de escape, el sitio donde se encuentra el túnel es específico para cada rata. El laberinto se encuentra en un cuarto de 4X4 con paredes blancas, en una de las cuales se colocaron claves visuales. Adicionalmente este cuarto cuenta con un sistema de vídeo y una televisión. En el centro del laberinto a una altura de 1 m por encima del mismo está colocada una bocina, la cual se utiliza para emitir un ruido blanco de 90 decibeles (90dBs). En esta prueba el ruido blanco, y el espacio abierto funcionan como estímulos aversivos; en la figura 10 se puede apreciar el laberinto utilizado en este trabajo.



Fig. 10 Fotografía del laberinto de Barnes  
del laboratorio de Neuroinfecciones



Las ratas son entrenadas para localizar el túnel de escape y se les da un tiempo no mayor a 4 min. La forma de entrenar una rata consiste en colocarla inicialmente en el túnel de escape durante 60 seg. Inmediatamente después se coloca a la rata en el centro del laberinto dentro de un contenedor cilíndrico durante 10 seg. en presencia del ruido blanco. Posteriormente se retira el cilindro y se le permite explorar libremente el laberinto para encontrar el túnel de escape. Una vez que la rata entra al túnel de escape, se apaga el ruido y se deja a la rata en éste durante 30 seg. En los siguientes entrenamientos, se inicia colocando a la rata dentro del contenedor cilíndrico en el centro del laberinto (ver esquema representativo en la Figura. 11a).

Para calificar la eficiencia de la resolución cuantificamos el tiempo que tarda la rata en resolver la prueba, la estrategia que utiliza, el número de errores, perseverancias y distancia. Las ratas pueden resolver el laberinto de forma aleatoria. Es decir resuelven el laberinto al azar, sin ningún patrón. Pueden utilizar la estrategia serial, si lo que hace es dirigirse a un hoyo que no es el túnel de escape y a partir de éste recorrer de forma secuencial los hoyos hasta que encuentra el túnel de escape. Si al iniciar la exploración del laberinto desde el centro, la rata se dirige directamente al túnel de escape o a dos agujeros de distancia en cualquiera de las dos direcciones, consideramos que esta empleando una estrategia espacial (Figura 11b).

Consideramos que la rata comete un error cuando busca el túnel de escape en un agujero que no da acceso al mismo y si busca en un agujero equivocado más de una vez comete una perseverancia. La distancia se mide contando el número de



agujeros que existen entre el primer agujero que busca la rata inmediatamente después que es liberada del cilindro y el túnel de escape, contando en dirección del lado más cercano, de tal forma que la distancia máxima es 20. Todos los entrenamientos fueron videograbados y calificados posteriormente. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de dos vías y posteriormente con una prueba *post hoc* Student Newman Keuls.

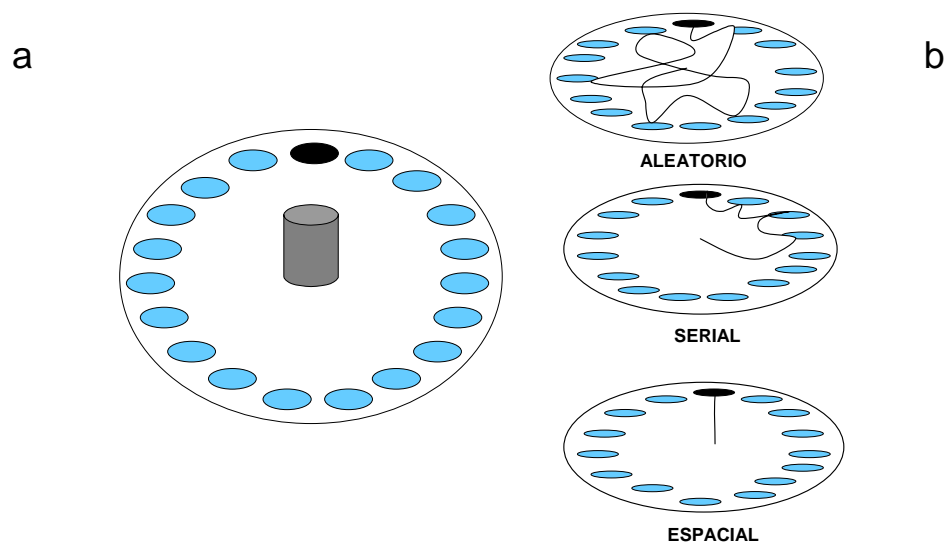


Figura 11 Laberinto de Barnes. En este dibujo representativo del Laberinto de Barnes, se muestra la disposición del cilindro en el centro de la mesa así como el hoyo en el que se coloca el túnel de escape. En el panel b se han dibujado las estrategias que puede usar la rata para resolver el laberinto.

De esta forma, 42 ratas implantadas en el VL fueron entrenadas a las 01:00 hrs. Se realizaron 19 entrenamientos y una vez que consideramos que las ratas estaban entrenadas (es decir, cometían menos de 5 errores y tardaban menos de 1 min) para resolver el laberinto de Barnes, se calificó su ejecución a lo largo del ciclo luz-oscuridad empleando los siguientes horarios: 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas.



Finalmente éstas ratas se dividieron en tres grupos: vehículo (n=18, solución salina, 5µl) somatostatina (SST, 0.3nmol/5µl, n=10). El grupo experimental fue tratado con CST (0.3nmol/5µl) (n=14). Se emplearon dos horarios para la administración del tratamiento correspondiente, 12:30 y 00:30 horas. Treinta min después de la administración, se realizó la prueba.

Las ratas implantadas en el hipocampo, fueron entrenadas (22 veces) para resolver el LB antes de la cirugía y una semana después de la cirugía fueron re-entrenadas 8 ocasiones mas. Las ratas fueron distribuidas al azar en tres grupos vehículo (n=10), SST (n= 10) y CST (n=10). Se utilizaron dos horarios para la administración del tratamiento 12:30 y 00:30 horas. Treinta min después, se realizó la prueba.

Adicionalmente 32 ratas implantadas en el VL fueron distribuidas en cuatro grupos, dos grupos recibieron vehículo (n=16) y dos grupos CST (n=16). Todos ellos fueron administrados a las 00:30 horas. Treinta min después de la administración se empezó a entrenar a un grupo vehículo y a un grupo CST. Doscientos cuarenta min después, empezó el entrenamiento de los dos grupos restantes. Se realizaron 4 entrenamientos (una sesión). Las ratas fueron entrenadas por 4 sesiones, las cuales empezaban con la administración del tratamiento. El total de administraciones a lo largo del experimento fue de 4.



*Actividad Motora:* En estos experimentos se utilizaron ratas implantadas con una cánula en el VL, para lo cual utilizamos el protocolo descrito anteriormente. Para medir la actividad motora utilizamos dos pruebas: la viga de equilibrio y el Rota Rod.

*Viga de equilibrio:* Es una prueba más compleja que aquellas utilizadas para evaluar sólo la actividad motora espontánea. La prueba de la viga de equilibrio nos permite evaluar simultáneamente la coordinación y la habilidad motora (Drucker-Colín y García-Hernández, 1991). Consta de una serie de vigas de madera de 2 metros de longitud y diferentes grosores: 3, 6, 12, 18 y 24 mm, colocadas sobre dos pedestales de tal manera, que forman un ángulo de  $15^\circ$ . En el extremo más alto se coloca la caja donde habitualmente se encuentra cada rata (Figura 12). El entrenamiento consiste en enseñar a la rata a recorrer las vigas desde el extremo más bajo hasta su caja. Se inicia con la viga de 24mm; una vez que la recorre en su totalidad se cambia por la viga de 18 mm y así sucesivamente, hasta que recorre la viga de 3 mm sin pausas. Se cuantifica el tiempo que tarda la rata en recorrer la viga hasta que entra a su caja.

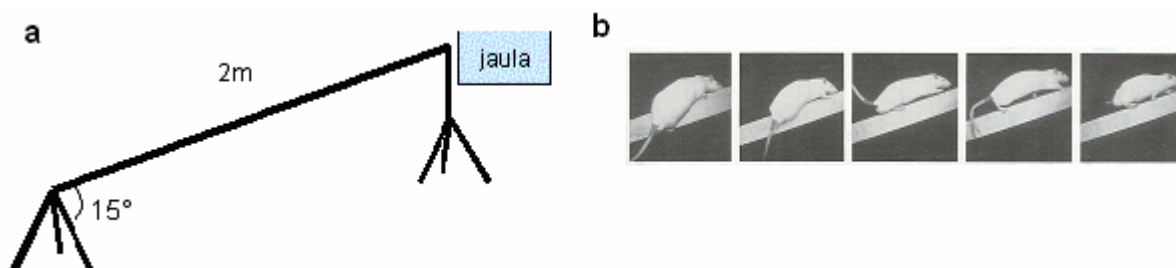


Fig. 12 Modelo de la viga de equilibrio de Drucker. (Drucker-Colín y García-Hernández, 1991). En a se observa la forma en que son dispuestas las vigas sobre dos pedestales de madera. Mientras que en b se observa como va evolucionando la habilidad con que las rata se mantienen sobre la viga al paso de los entrenamientos.



De esta forma entrenamos 11 ratas implantadas con una cánula en el VL y cuando consideramos que las ratas resolvían eficientemente, es decir terminaban de recorrer la viga sin pausas y sin caer de la viga hasta su caja en un tiempo máximo de 1min, procedimos a realizar el experimento. Primero calificamos la ejecución de las ratas en cada uno de los siguientes horarios: 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 hrs. Posteriormente se dividieron en dos grupos, vehículo 5  $\mu$ l (n=6) y CST (n=5) 0.3nmol/5 $\mu$ l. La administración del tratamiento fue a las 12:30 y 00:30 horas. Treinta min después de la administración se realizó la prueba.

*Rota Rod:* El rota rod (RR) consiste de un rodillo central sobre el cual son colocados los sujetos durante la prueba. Discos opacos separan en compartimentos este rodillo, de tal forma que es posible evaluar hasta 4 ratas de manera simultánea, sin que se distraigan entre si. Cada compartimiento tiene su propio cronómetro. En este modelo la rotación

de los rodillos es de 3, 6, 8, 10, 13 y 15 rpm.

Se cuantifica el tiempo que tarda la rata en caer de los rodillos (Figura 13).

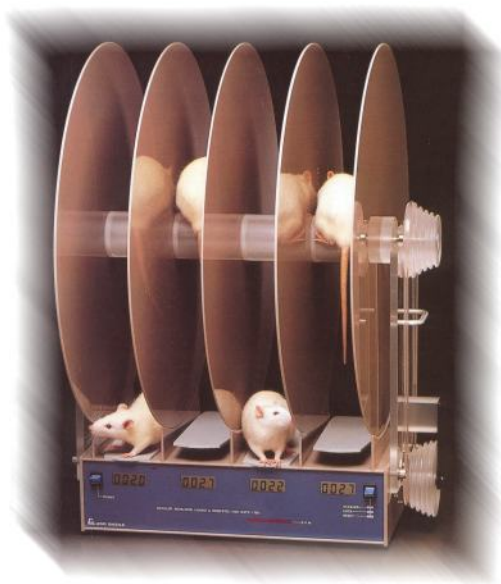


Figura 13 Rota Rod. En la figura se muestra el Rota Rod Ugo Basile, modelo que utilizamos en estos experimentos, en el cual es posible probar 4 ratas de manera simultánea.



La prueba consiste en colocar a la rata en el rodillo sin movimiento durante un minuto. Posteriormente se coloca a la rata en el rodillo utilizando cada una de las velocidades, durante un minuto. Finalmente, las ratas son evaluadas 4 veces consecutivas utilizando la máxima velocidad. Dieciséis ratas implantadas con una cánula en el VL fueron administradas a las 00:30 horas, con vehículo (n= 8) o con CST (n= 8) y 30 o 240 min después realizó la prueba. Se cuantifica el tiempo que tarda la rata en caer.

*Sueño:* Para analizar este parámetro se utilizaron ratas implantadas con una cánula en el VL y un juego de electrodos para registrar el electroencefalograma (EEG) de manera convencional. Los electrodos para registro del electrocorticograma (EEC) se colocaron uno en cada hueso parietal considerando las siguientes coordenadas: posterior 4 y lateral 2.5 y un electrodo sobre el hueso frontal como referencia. Adicionalmente se usaron dos electrodos de alambre insertados en los músculos de la nuca para registrar el electromiograma (EMG).

Con los electrodos colocados de esta forma se registró el EEG que nos permitió diferenciar: la vigilia (V), el sueño de ondas lentas 1 y 2 (SOL1 y SOL2) y el sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR). La cirugía fue realizada bajo anestesia general (halotano 2-3%). Después de la cirugía las ratas se colocaron individualmente en cajas de acrílico para su recuperación, durante una semana. Las ratas se habituaron a las condiciones de registro 24 horas antes del experimento. Las cámaras de registro son individuales, sonoamortiguadas, tienen iluminación individual y un sistema de aire que



mantiene la temperatura constante a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las cámaras tienen una ventana a través de la cual se puede observar la conducta de la rata sin perturbarla.

Después de la habituación se registró el EEG a lo largo del ciclo luz-oscuridad en los siguientes horarios: 09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00. La duración de los registros fue de 4 horas. Se emplearon tres grupos; dos grupos control, uno tratado con solución salina  $5\mu\text{l}$  y otro con SST ( $0.3\text{nmol}/5\mu\text{l}$ ). El grupo experimental recibió CST ( $3\text{nmol}/5\mu\text{l}$ ). Los horarios de administración empleados fueron 13:00 y 01:00 horas. El registro empezó inmediatamente después de la administración. Los registros fueron calificados visualmente y analizados con el programa HYPNOS. Los resultados fueron tratados estadísticamente con un ANOVA de una vía y con la prueba *post hoc* Duncan.

*AMPc*: La determinación de AMPc se realizó utilizando un kit inmunoenzimático para AMPc (Amersham), el cual nos permite cuantificar las concentraciones de este nucleótido en un rango de 12.5 a 3600 fmol. El fundamento de la prueba se basa en la competencia entre el AMPc producido por la muestra y una cantidad fija de AMPc marcado con peroxidasa, en donde un número limitado de un anticuerpo específico se pega al AMPc marcado. La unión de este último es inversamente proporcional a la concentración del ligando no marcado (muestra). La concentración de la muestra se deduce a partir de una curva patrón.

*Procedimiento para obtener la muestra*: Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente después se extrajo el hipocampo y el puente. Las





muestras se colectaron en los horarios empleados en el resto de las pruebas. El tejido se colocó inmediatamente después en hielo seco y se realizó el siguiente tratamiento.

La muestra se homogenizó en una solución de ácido tricloracético al 6%, se centrifugó a 2000g por 15 min a 4°C, (precipitación de proteínas). El sobrenadante (fase acuosa), contiene el AMPc, éste se lava 5 veces con una solución saturada de éter di-etílico. Para recuperar el AMPc de la fase acuosa, la muestra se somete a un proceso de liofilización. Posteriormente, las muestras se preparan disolviéndolas en un buffer de ensayo (buffer acetatos 0.05 M pH 5.8, 0.02% de albúmina bovina y conservadores). Los estándares para la curva, se preparan con diferentes cantidades de una solución de AMPc de 32 pmol/ml y buffer de ensayo. Tanto la curva estándar como las muestras se corren simultáneamente en la misma placa. Las muestras se leen a 450 nm en un lector de ELISA y las densidades ópticas se convierten en porcentaje de pegado con la siguiente ecuación:

$$\% B/BO = (DO \text{ muestra} - DO \text{ NSB}) / (DO \text{ Bo} - DO \text{ NSB}) \times 100$$

DO: Densidad Optica en nm  
Bo: Blanco  
DONSB: Pegado no específico

Con los valores de los estándares se realiza la curva patrón, en donde se interpolan los valores obtenidos de las muestras (% B/Bo).

Para cuantificar el efecto de CST sobre la producción de AMPc, se utilizaron dos grupos de ratas, las cuales fueron sacrificadas a las 13:00 y 01:00 horas, se les disecó la corteza cerebral y el hipocampo e inmediatamente se sometieron al siguiente



protocolo: Se incubaron a 37°C durante una hora en un medio de cultivo (D-MEM con alta glucosa), enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, HEPES 10mM, bicarbonato de sodio 2 g/l, antibióticos antimicóticos (penicilina, estreptomina y anfotericina B), insulina (4.5 g/ml) y 100 ng/ml de CST o 100 ng/ml de SST. Al término del tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo y posteriormente las muestras se procesan utilizando el protocolo descrito anteriormente. Los resultados fueron analizados estadísticamente con una ANOVA y con la prueba *pos hoc* Duncan.

*Microarreglos:* Para este experimento se emplearon 7 ratas previamente implantadas con una cánula en el VL, de las cuales 4 fueron administradas con salina y 3 con CST a la 01:00 y cuatro horas después de la administración las ratas fueron sacrificadas por decapitación. El hipocampo y el puente fueron disecados e inmediatamente sumergido en RNA*later* (Ambion, Austin TX) con la finalidad de detener la actividad de las RNAsas. Posteriormente las muestras fueron almacenadas a 4°C. El RNA total fue extraído de la muestra empleando tiocinato de guanidina e inmovilizado sobre filtros de fibra de vidrio empleando el kit RNAqueous (Ambion). La transcripción reversa del mRNA se llevo a cabo incubando 0.5µg de la muestra durante 10 min a 70°C con un primer de deoxitimidina (dT, 2µl). Posteriormente la elongación se llevo a cabo adicionando la Transcriptasa Reversa (Superscript II, Invitrogen), deoxinucleotidos (dATP, dGTP, dTTP) y un deoxinucleotido marcado con <sup>33</sup>P (P-dCTP, 10 mCi/ml, con una actividad específica de 3000C/mmol) (ICNN Radiochemicals) e



incubando por 90 min a 37°. El cDNA marcado se purificó pasándolo a través de una columna para cromatografía Bio-Spin 6 (BioRad, Hercules, CA).

Posteriormente el  $^{33}\text{P}$ -cDNA fue hibridizado a una membrana para microarreglos GeneFilter (Research Genetics, Huntsville, AL). Para evitar el pegado de copias de segmentos inespecíficos, se prehibridizó la membrana con 5 ml de solución MicroHyb (Research Genetics) y 5  $\mu\text{l}$  de polyA, 5  $\mu\text{l}$  de DNA desnaturalizado de ratón y 1  $\mu\text{l}$  de DNA desnaturalizado de humano. Se incubó a 42°C durante 2 horas. La sonda purificada se desnaturalizó a baño María durante 3 min y cuidadosamente se adicionó a la solución de prehibridación. Después de agitarlo cuidadosamente se incubó de 12 a 16 horas a 42°C y 6 rpm. Al término de la hibridación, se lavó la membrana un par de veces con SDS 1% y SSC 2X. Luego las membranas se colocaron sobre papel filtro humedecido con agua desionizada, cubiertas con plástico y acomodadas sobre un casete de exposición ("phosphor screen", Kodak). La imagen de la autoradiografía fue capturada con el programa FX-Phosphoimager (BioRad) a 50  $\mu\text{m}$ /pixel (Figura 14).

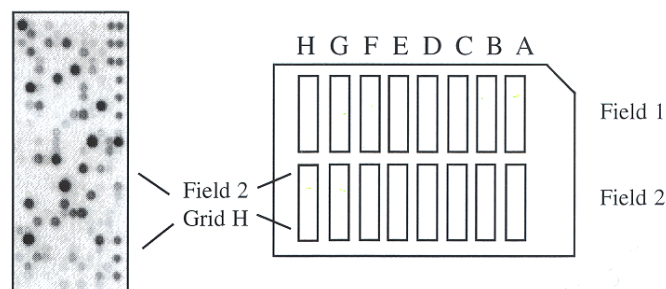


Figura 14 Membrana de microarreglos . Dibujo de una membrana de nylon como las utilizadas en este experimento, las cuales permiten analizar de manera simultánea 5128 genes.



*Analgesia.* Para esta parte del experimento se utilizaron 42 ratas implantadas con una cánula en el ventrículo lateral, con las cuales se formaron los siguientes grupos: vehículo Salina, cortistatina, CST; somatostatina, SST; orexina, ORX; péptido del lóbulo intermedio semejante a corticotropina, CLIP y regulador de la transcripción de cocaína y anfetamina, CART. Estos grupos fueron administrados con 0.3 nmol del péptido correspondiente a las 01:00 horas. La prueba de analgesia se llevo a cabo utilizando un aparato Hot Plate Socrel modelo DS35 (Figura 15), el cual consta de una placa de acero inoxidable (25 X 25 cm) y de un cilindro de plexiglas (20 cm de diámetro y 20 cm de altura) con el que se restringe el movimiento de las ratas. Una vez que este aparato alcanza una temperatura de 55°C la mantiene constante. Para el experimento las ratas fueron colocadas en el Hot Plate dentro del cilindro y se cuantificó el tiempo que tardó la rata en empezar a lamer sus extremidades o a saltar de la placa. Se realizaron 2 evaluaciones, 30 y 240 min después de la administración.

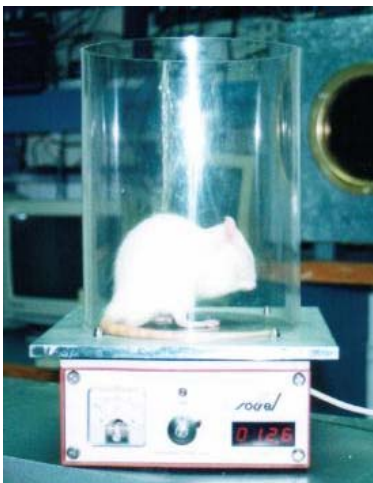


Figura. 15. Hot Plate. En esta fotografía mostramos el aparato que utilizamos para realizar la prueba de analgesia y el momento en que la rata lame sus patas delanteras, marcando el final de la prueba.



*Temperatura corporal:* Para esta prueba se utilizaron 42 ratas implantadas con una cánula dirigida al ventrículo lateral, a través de la cual se les administró a la 01:00 a.m. el péptido (0.3 nmol) correspondiente según el grupo al que fueron asignadas: vehículo (salina), cortistatina (CST), somatostatina (SST), orexina (ORX), corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) y cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART). La temperatura fue registrada, con un termistor rectal conectado a termómetro digital FCH. La temperatura corporal fue registrada en dos ocasiones, a los 30 y a los 240 min después de la administración. Los resultados fueron tratados estadísticamente con una prueba de ANOVA de una vía y un aprueba *pos hoc* Duncan.

*Ingesta de alimento:* Cuarenta y dos ratas Wistar rats (250-350 g) implantadas con una cánula en el ventrículo lateral fueron utilizadas en este experimento. Se pesó a las ratas y se determinó la cantidad de alimento que ingirieron por día durante 5 días, cada hora, en ambos puntos del ciclo de luz-oscuridad, para la realización de una línea base de ingesta de alimento. Posteriormente, se analizó el efecto de la administración de salina, CST, SST, ORX, CLIP y CART sobre la ingesta de alimento en las ratas saciadas. La administración del tratamiento correspondiente se realizó a las 09:00 y 21:00 horas. Una hora después de la administración se midió la cantidad de alimento que consumió cada rata y se continuó midiendo cada hora durante 4 horas. Al día siguiente (24 horas después) de la administración se midió de nuevo la cantidad de alimento ingerido y se determinó el peso de las ratas.



Finalmente, para verificar la posición de la cánula, las ratas fueron perfundidas transcardialmente con 150 ml de PBS y después con 150 ml de paraformaldehído al 4%. Se disecaron los cerebros y fueron procesados para el análisis histológico con violeta de cresilo (Figura 16).



Figura 16. Posición de la cánula guía. Corte coronal de cerebro de rata teñido con violeta de cresilo, donde se observa el tracto de la cánula guía dirigida al ventrículo lateral.



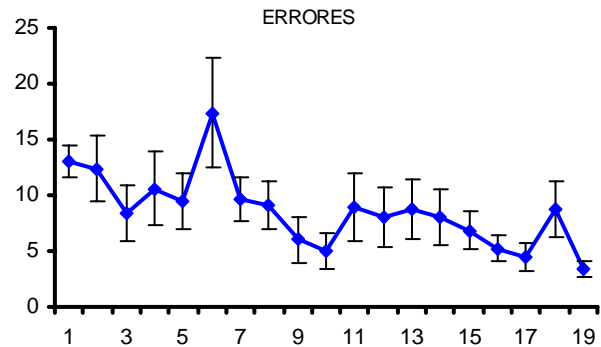
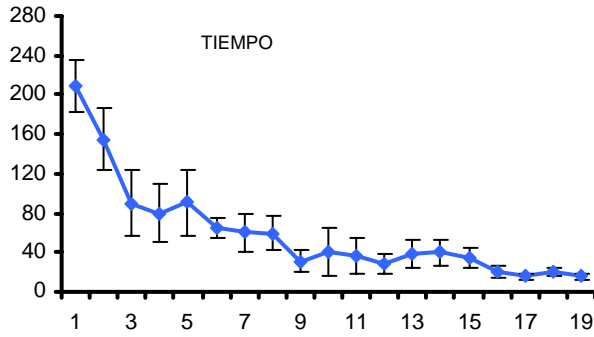
## Resultados

En la gráfica 1 a-e podemos observar, el comportamiento de las ratas durante los 19 entrenamientos a los que fueron sometidas para que resolvieran el LB. En a) se muestra el tiempo (media del tiempo  $\pm$  ES, seg.) que utilizan para resolver el laberinto, en b) los errores y en c) las perseverancias cometidas durante el entrenamiento, en d) la distancia y en e) la estrategia utilizada. En la gráfica a) se observa claramente la curva de entrenamiento. Durante las primeras sesiones de entrenamiento las ratas tardan más de un minuto y buscan el túnel de escape de forma aleatoria. En las siguientes sesiones, el tiempo utilizado comienza a disminuir, así como los errores y perseverancias. Simultáneamente la estrategia utilizada para encontrar el túnel de escape cambia a serial y espacial. En el entrenamiento 19, cuando los sujetos tardan alrededor de 10 seg., y utilizan una estrategia serial o espacial, para encontrar el túnel de escape, consideramos que resuelven eficientemente el LB. La distancia recorrida no varía a lo largo de los entrenamientos.

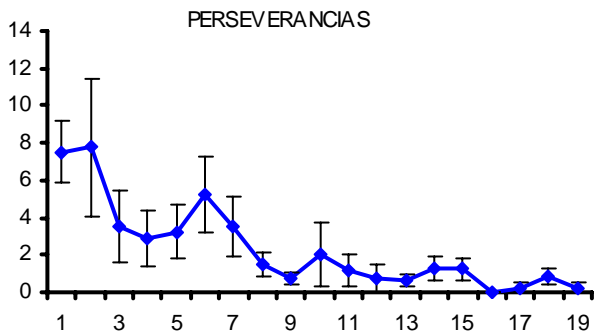
En la gráfica 2 a-d, mostramos la eficiencia de las ratas para resolver el LB en diferentes puntos del ciclo luz-oscuridad. El tiempo a), las estrategias b), los errores c) y perseverancias d) muestran un patrón de expresión diferente que depende de la fase de luz del fotoperiodo. El tiempo utilizado para encontrar el laberinto es menor cuando la rata es evaluada en la fase de oscuridad (21:00 hrs.,  $10.2 \pm 2.3$  seg.; 01:00 hrs.,  $10.6 \pm 0.7$ seg; 05:00 hrs.,  $13.5 \pm 1.1$ seg; 09:00 hrs.,  $15.2 \pm 1.3$  seg.) que en la fase de luz del ciclo (13:00hrs:  $35.5 \pm 5.36$  seg.; 17:00 hrs.,  $32.6 \pm 1.3$ ).



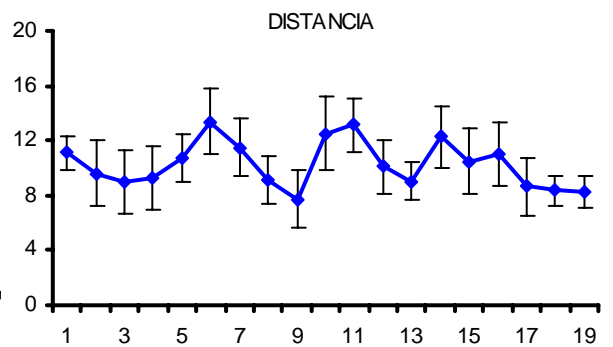
1a



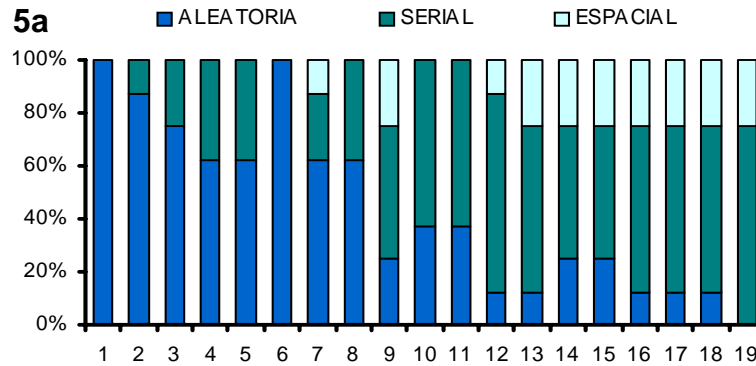
3a



4a



5a

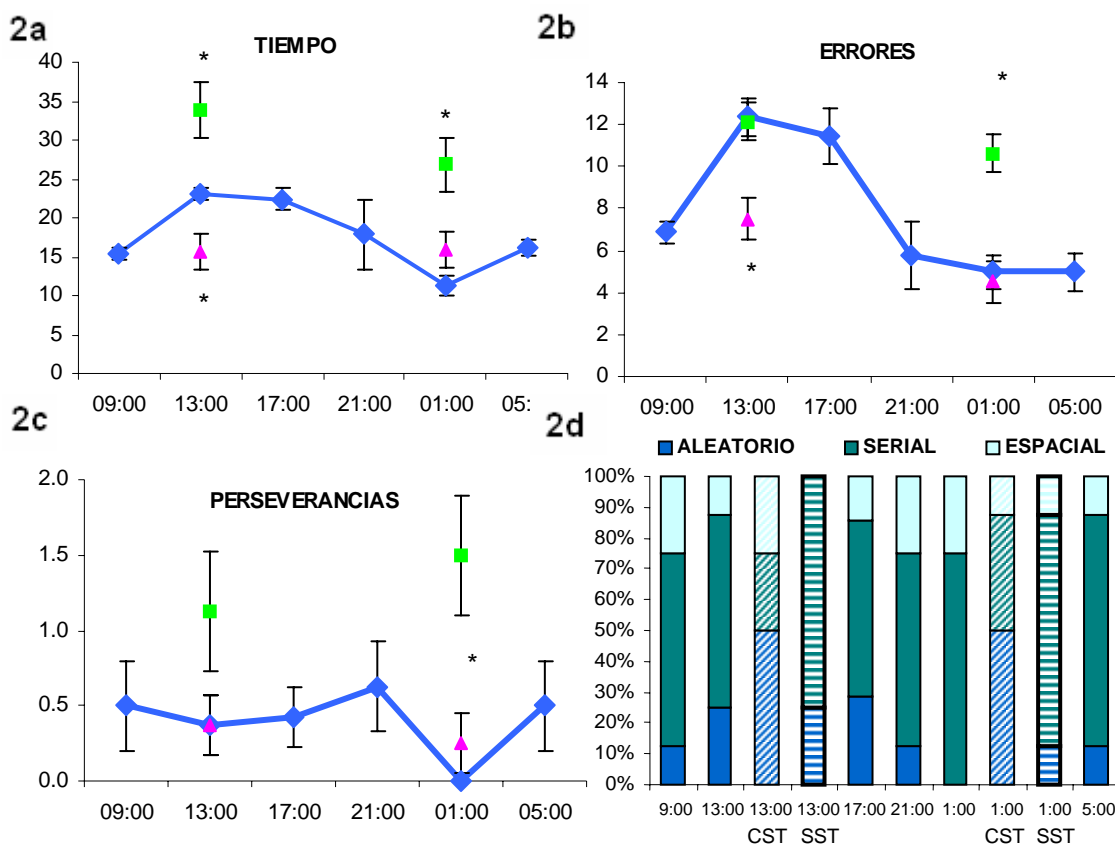


Gráfica 1. Entrenamiento. En estas gráficas se muestra el comportamiento de la ratas durante el entrenamiento en el laberinto de Barnes, la media del tiempo en segundos  $\pm$  el ES, se muestra en el panel a). La media de los errores  $\pm$  el ES en b). La media de las perseverancias ( $\pm$  ES) en el panel c). La distancia (media  $\pm$  ES) en d) y las estrategias en empleadas por las ratas a lo largo del entrenamiento expresadas como el porcentaje de las ratas que eligió dicha estrategia en el panel e). Para todas las gráficas el eje de las ordenadas muestra el número de entrenamiento.





De la misma manera, los errores y las perseverancias son significativamente menores en la fase de oscuridad del fotoperíodo (Figura 2b,c). Las estrategias también muestran un patrón de expresión que depende de la hora del día; durante la fase de oscuridad del ciclo las ratas resuelven el laberinto preferente utilizando la estrategia serial y espacial; mientras que durante el periodo de luz lo resuelven principalmente utilizando la estrategia serial y de forma aleatoria (Figura 2d).



Gráfica 2 a-d. En esta gráfica se muestran las variaciones diurnas en la eficiencia para la resolución del laberinto de Barnes. Panel a) en función del tiempo de ejecución (media  $\pm$  ES, seg.). Media del número de errores ( $\pm$  ES) en b) y perseverancias (Media  $\pm$  ES) cometidos durante la realización de la prueba en el panel c) y finalmente en el panel d) estrategia utilizada. Adicionalmente se muestra el efecto de la CST (cuadros verdes) y la SST (triángulos rosas) sobre la ejecución del laberinto de Barnes, administrados a las 13:00 y 01:00 horas. (\* $p$ <0.05 vs. salina). Las barras achuradas, muestran el efecto de la CST a las 13:00 y 01:00 horas. Mientras que las barras con líneas verticales muestran el efecto de la SST a las 13:00 y 01:00 horas. En el eje de las ordenadas se muestra la hora del día, para todas las gráficas.

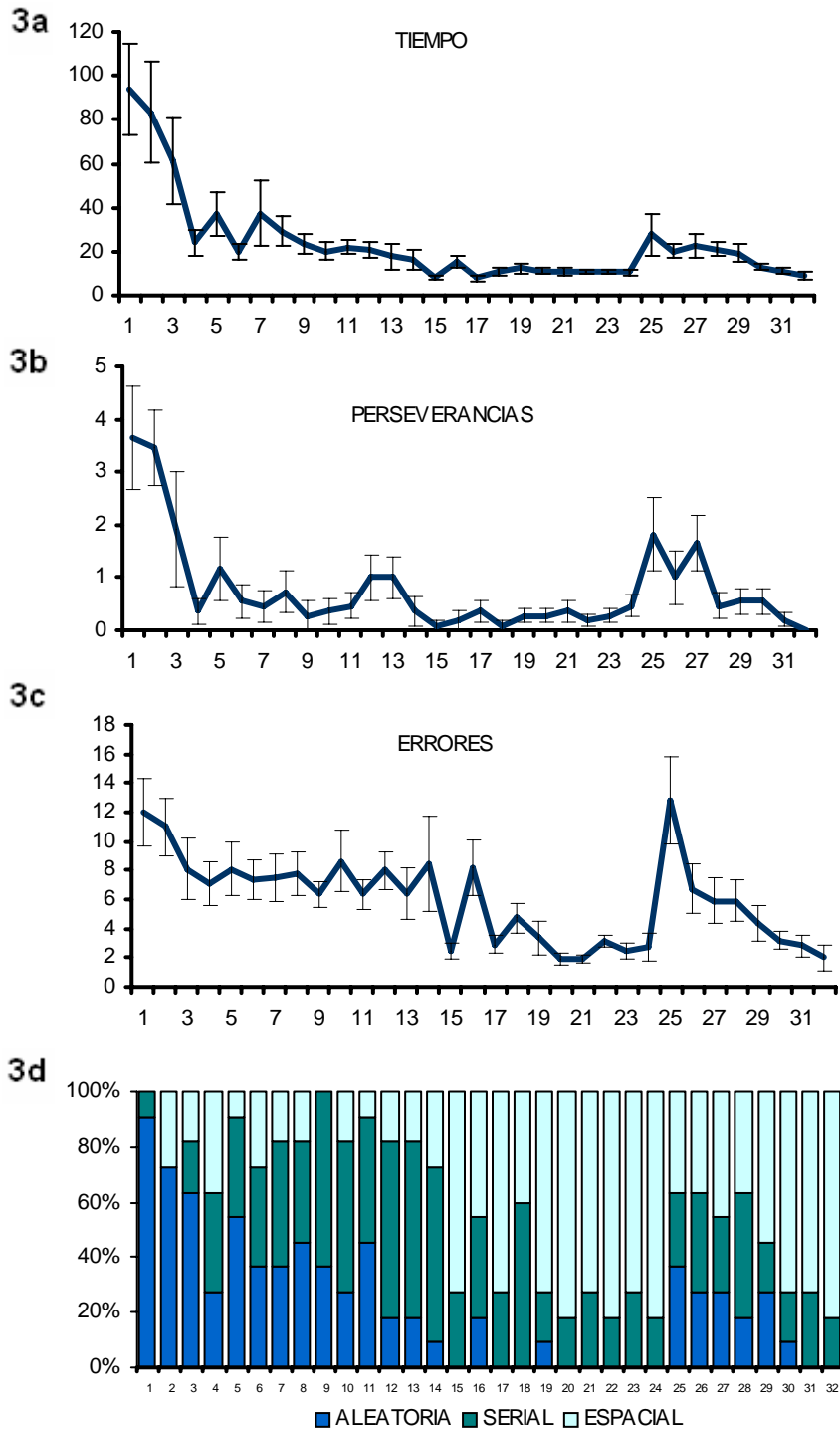


En el análisis de los resultados del efecto de la CST sobre la ejecución de las ratas en el LB a las 01:00 y 13:00 horas, encontramos que el tiempo se incrementa significativamente respecto al grupo control en ambos puntos representativos del ciclo luz-oscuridad (CTL 01:00,  $10.6 \pm 0.7$  seg. vs. CST 01:00,  $31.0 \pm 4.9$  seg.; CTL 13:00,  $25 \pm$  seg. vs. CST 13:00,  $40 \pm$  seg.). Mientras que el efecto de la CST sobre la estrategia empleada depende del ciclo luz-oscuridad; a las 13:00 horas la CST principalmente disminuye la estrategia serial provocando un incremento en la resolución espacial y al azar; mientras que a las 01:00 horas provoca la aparición de la resolución aleatoria disminuyendo la estrategia serial. La estrategia espacial también disminuye. Por otro lado, la administración de la SST a las 13:00 horas, provoca la desaparición de la estrategia espacial, incrementando la resolución al azar. A la 01:00 a.m., la SST provoca la aparición de la resolución al azar a costa de la disminución de la estrategia serial, la espacial permanece sin cambio. Adicionalmente, observamos que los sujetos que han recibido CST comenten mas errores y perseverancias, únicamente a las 01:00 horas (Gráfica 2 a-d). Contrariamente la SST, disminuye significativamente el tiempo y los errores durante la luz. Durante la fase de oscuridad la SST no afecta significativamente tiempo, errores ni perseverancias.

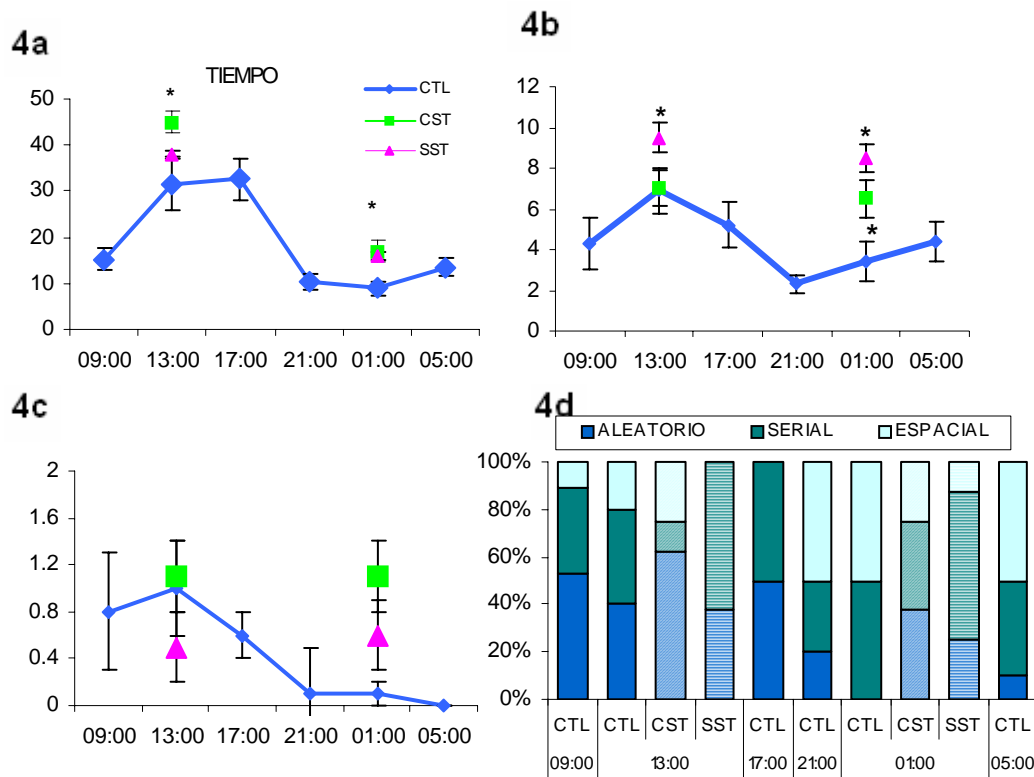
En la gráfica 3 a-d se observa el comportamiento que tuvo el grupo de ratas intactas para resolver el LB. Tiempo a), errores b), perseverancia c) y estrategias d) muestran un patrón similar al del grupo entrenado previamente. Las ratas fueron sometidas a la cirugía estereotáxica donde se les implantó un par de cánulas dirigidas



al hipocampo entre los días 24 y 25 de los entrenamientos. En el entrenamiento número 32 podemos observar que las ratas recuperan la eficiencia para resolver el LB en todos los parámetros evaluados, que se perdió después de la cirugía.



Gráfica 3. En estas gráficas mostramos el comportamiento de las ratas durante el entrenamiento, antes y después de la cirugía. En a) graficamos el tiempo (en segundos), en b) las perseverancias y en c) los errores; en estas gráficas el eje de las abscisas representa la media de los valores  $\pm$  ES. En d) las estrategias utilizadas, expresadas en porcentaje del total de las ratas que emplearon dicha estrategia. La cirugía se llevó a cabo entre el día 24 y 25 de los entrenamientos. Para todas las gráficas el eje de las ordenadas representa los entrenamientos.



Gráfica 4. Efecto de la administración intrahipocampal de la CST. En el panel a) se observa el efecto de la CST sobre el tiempo en segundos de ejecución en el laberinto de Barnes, en b) el número de errores, en c) el número de perseverancias y en d) la estrategia empleada para resolver el laberinto 30 minutos después de la administración de la CST (barras achuradas) y la SST (barras con líneas verticales). Las administraciones se realizaron a las 13:00 y 01:00 horas. En todas las gráficas se muestran las variaciones diurnas del grupo control en cada uno de los parámetros evaluados. Los cuadros verdes representan a la CST, los triángulos rosas a SST. \* $p < 0.05$  comparado con el grupo control para ambos tratamientos.

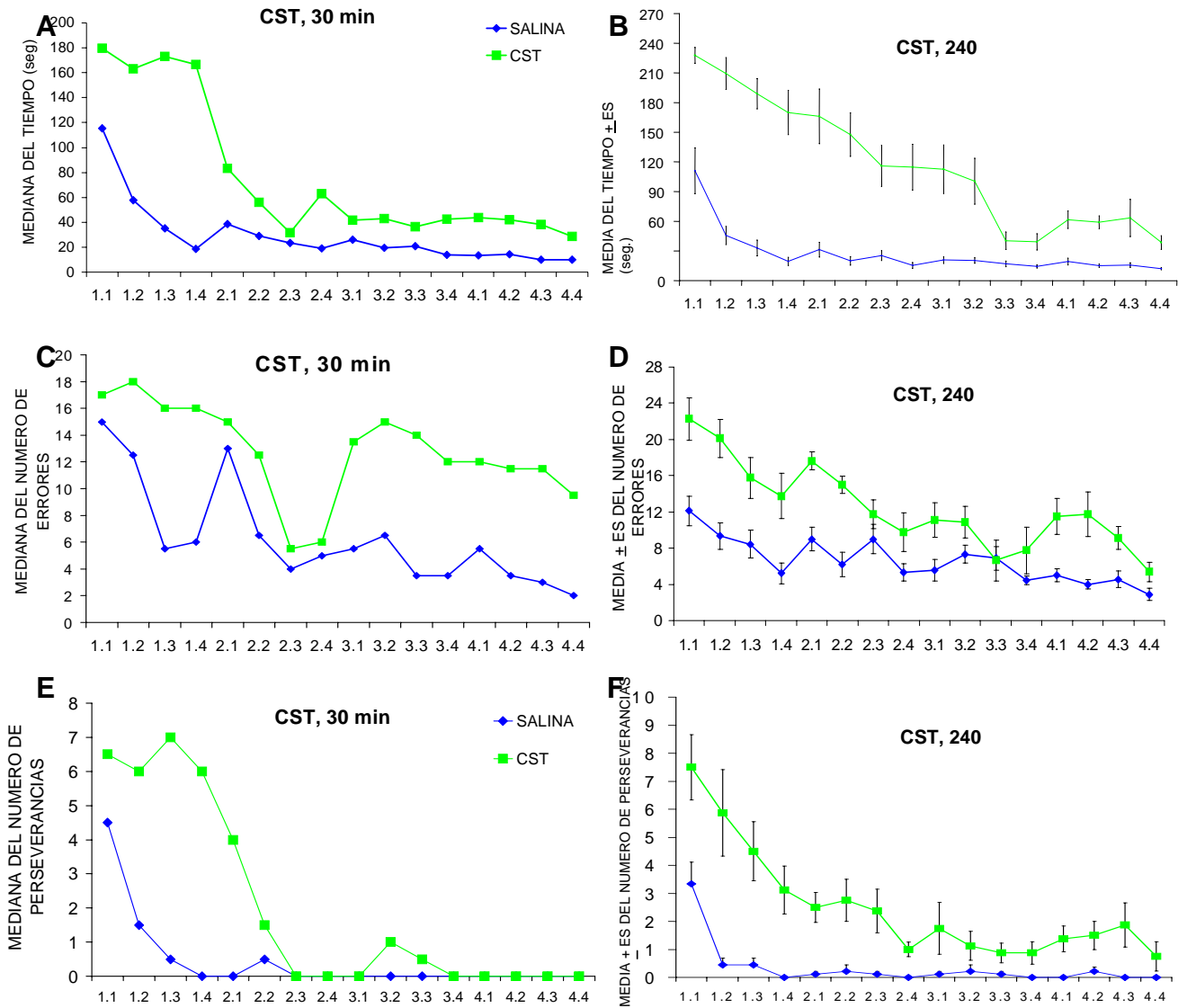


La administración intrahipocampal de la CST 30 minutos antes de la prueba, provoca un incremento significativo en el tiempo que tarda la rata para resolver el LB, en ambos puntos significativos del ciclo luz-oscuridad (Gráfica 4a). La administración de la SST no incrementa significativamente el tiempo de resolución (Gráfica 4a). La administración de CST incrementa los errores y las perseverancias de manera significativa, únicamente a la 01:00 a.m. (Gráfica 4b,c).

Mientras que la administración de SST incrementa significativamente, en ambos puntos del ciclo, los errores y no provoca ningún cambio en las perseverancias (Gráfica 4,c). Tanto CST como SST provocan un cambio en la elección de la estrategia empleada por la rata para resolver el laberinto (Gráfica 4d). A las 13:00 horas la CST disminuye la expresión de la estrategia serial, la expresión de la estrategia espacial no cambia; mientras que las 01:00 horas favorece la disminución de la estrategia serial y espacial, favoreciendo la aleatoria. En cambio la administración de la SST en ambos puntos del ciclo favorece la expresión de la estrategia serial y disminuye la estrategia espacial (Gráfica 4d).



La administración repetida de la CST 30 y 240 min. previamente al entrenamiento en el LB provoca un incremento en el tiempo que tarda la rata en resolver el laberinto, así como un incremento en el número de errores (Gráfica 5a-d) y perseverancias cometidas (Gráfica 6), en ambos casos.



Gráfica 5. Efecto de la CST sobre el aprendizaje. En estas gráficas observamos el efecto de la CST sobre el tiempo a-b) que tarda la rata en resolver el laberinto de Barnes y los errores b-c) que comete. Las administraciones de la cortistatina se realizaron 30 o 240 min. antes de iniciar la sesión 1.1, 2.1, 3.1, 4.1 de los entrenamientos; se llevaron a cabo 4 entrenamientos por día. El eje de las ordenadas de la gráfica a) y c) representa en a) la mediana del tiempo y del número de errores cometidos respectivamente. En las gráficas b) y c) se muestra la media del tiempo y del número de errores. Las líneas azules representan los datos del grupo control y las verdes CST \*p<0.05.



Este incremento en las variables medidas va disminuyendo conforme se incrementa el número de entrenamientos, aunque no alcanza los valores del grupo salina. Las administraciones se realizaron antes (30 o 240 min) del primer entrenamiento del día 1, 2, 3 y 4. Los resultados se muestran en mediana del tiempo, errores y perseverancias por que, en el caso de la administración de la CST a los 30 min, la mayoría de las ratas no terminan la prueba antes de los 240 min establecidos en el método, por lo tanto representan solo un intervalo de tiempo, que nos impide tratar estadísticamente los datos con una estadística paramétrica, por lo cual se empleo la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

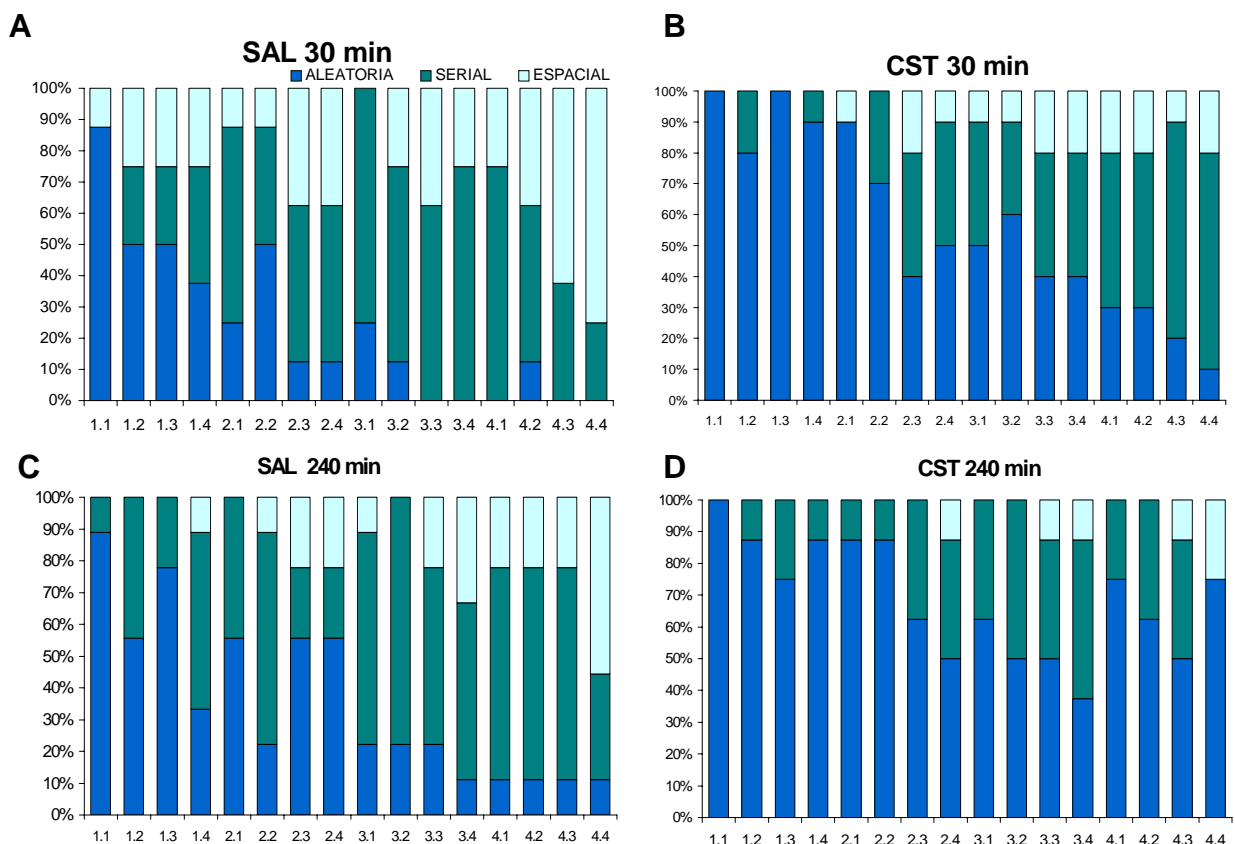


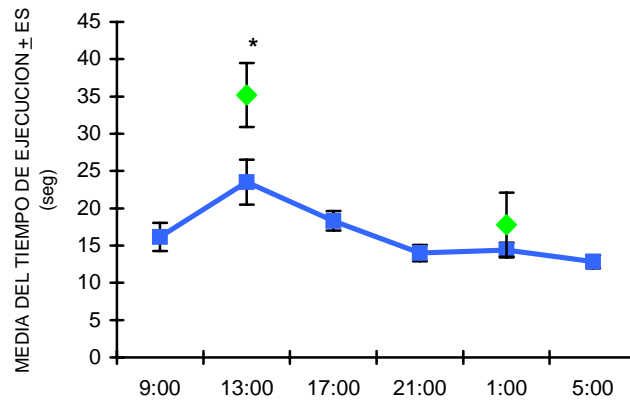
Figura. 6. Efecto de la administración icv de la CST sobre la elección de la estrategia para la resolución de la prueba del LB. En a) y b) se observa la forma en que resuelven el grupo control y el grupo tratado con la CST, 30 min después de haber recibido la inyección respectiva. En c) y d) se observa el efecto del tratamiento correspondiente 240 min después de la administración.



La utilización de las estrategias empleadas para resolver el laberinto en ambos grupos control, son semejantes a las del grupo control mostrada en la Gráfica 1e (Gráfica 6a). La administración de la CST provoca un cambio en la elección de la estrategia, que depende del tiempo que paso después de la administración del péptido (30 o 240 min) (Gráfica 6b,d). Cuando se evalúa el efecto de la CST después de 30 min de su administración, observamos un incremento de la estrategia serial y aleatoria (Gráfica b). Mientras que a los 240 min de administración de la CST observamos una mayor expresión de la conducta aleatoria para resolver el laberinto durante los entrenamientos (Gráfica 6d).

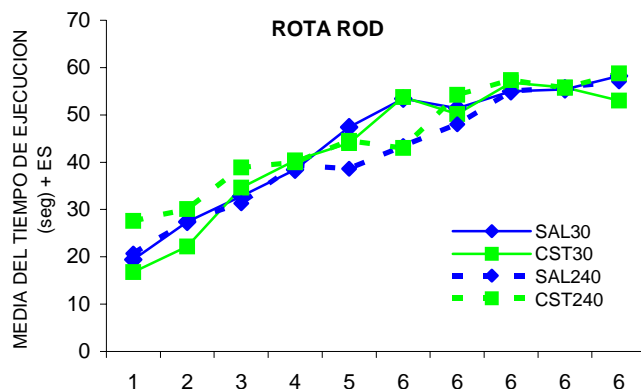
*Viga de Equilibrio:* En la gráfica 7 se observan las variaciones diurnas de la actividad motora de la rata, utilizando la viga de equilibrio. Se muestra el tiempo que tardan en realizar la prueba en diferentes puntos del ciclo del ciclo luz-oscuridad. Durante la fase de luz del ciclo, las ratas tardan más tiempo en resolver la prueba (13:00 hrs:  $23.5 \pm 2.96$  seg.), comparado con la fase de oscuridad (01:00 hrs:  $14.4 \pm 1.03$  seg.). Adicionalmente, en la misma gráfica observamos el efecto de la CST sobre la ejecución de la rata en ambos puntos del ciclo. La CST incrementa significativamente el tiempo de resolución comparado con el grupo control, únicamente a las 13:00 horas (\* $p < 0.05$ ).





Gráfica 7. Variaciones diurnas de la actividad motora de la rata en la viga de equilibrio y efecto de la CST sobre la ejecución. El eje de las ordenadas representa la media del tiempo total empleado por las ratas para resolver la viga de equilibrio en seg.  $\pm$  el ES (\* $p < 0.05$ ), las abscisas representan la hora día a la cual se realizó la prueba. La línea muestra las variaciones del grupo control y los rombos el efecto de la CST en los puntos evaluados del fotoperiodo.

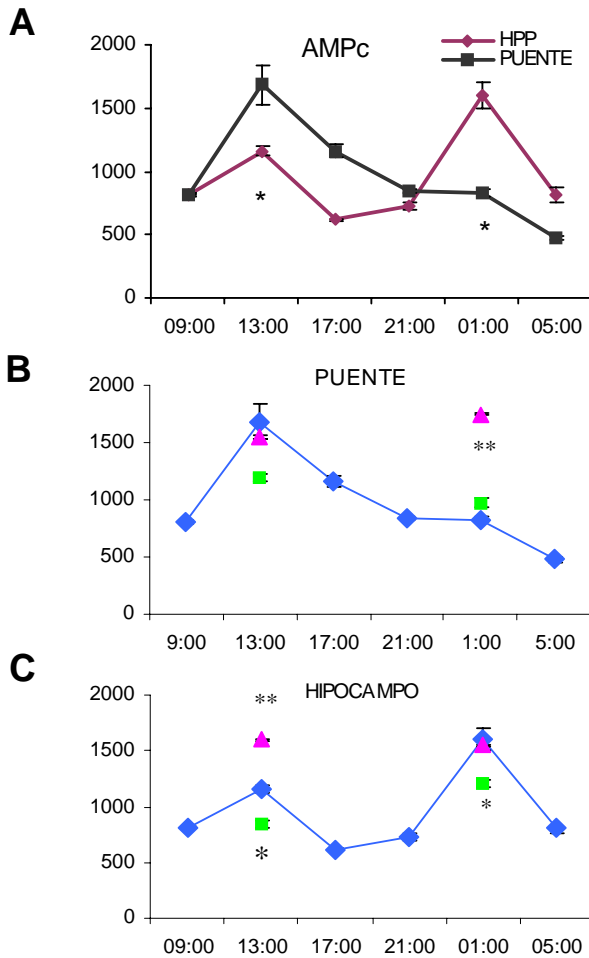
*Rota Rod*: Los resultados del control motor medido con la prueba del Rota Rod, en los cuatro grupos de ratas, entrenadas a la 01:00 a.m., muestran que no existen diferencias significativas, entre el grupo control y los grupos que recibieron CST, 30 o 240 min. antes de la prueba.



Gráfica 8. Efecto de la CST sobre la actividad motora, evaluada con el rota rod. Las líneas azules representan al grupo control, mientras que las verdes representan al grupo CST. Líneas continuas muestran el efecto después de 30 min de la administración y las líneas discontinuas muestran el efecto 240 min después de la administración. El eje de las abscisas represente los entrenamientos 1-5 donde las rpm. se incrementaron consecutivamente y el 6 representa la prueba a la máxima velocidad.



*AMPC*: La producción basal de AMPc en hipocampo durante el ciclo luz-oscuridad, muestra variaciones diurnas. Como tejido control utilizamos el puente de los mismos sujetos. El análisis de los resultados muestra que la concentración basal de AMPc en el hipocampo y en el puente (tejido control) tiene variaciones diurnas. En el hipocampo observamos la mayor concentración de este segundo mensajero a la 01:00 am ( $1523.5 \pm 63.7$  fmol) y la menor a las 17:00 hrs. ( $662.1 \pm 13.48$  fmol) (ver gráfica 9). En el puente, la mayor concentración se encuentra a las 13:00 horas ( $1682.5 \pm 149.9$ ). La CST disminuye significativamente la producción de AMPc, a las 13:00 y 01:00 hrs. (13:00 hrs., CTL  $1193.2 \pm 98.7$  vs. CST  $928.2 \pm 30.9$  fmol; 01:00 hrs., CTL  $1523.5 \pm 63.7$  fmol vs. CST  $1207.5 \pm 63.70$  fmol,  $p < 0.05$ ). Somatostatina incrementa la concentración basal de AMPc a la 01:00 ( $1744.8 \pm 7.8$ ) en el puente y a las 13:00 horas ( $1598.713 \pm 5.7$ ) en hipocampo.



Gráfica 10 Variaciones diurnas de la concentración de AMPc, en a) se muestran las concentraciones básicas en el puente (tejido control) e hipocampo de ratas sin manipulación experimental. \* $p < 0.05$  hipocampo vs. puente. b) Efecto de la CST y SST sobre la producción de AMPc en puente, a las 13:00 y 01:00; c) efecto de la CST y SST sobre la producción de AMPc en hipocampo, a las 13:00 y 01:00 horas. \* SAL vs. CST, \*\* SAL vs. SST,  $p < 0.05$ . Los cuadros verdes representan CST y los triángulos rosas SST. Los datos fueron tratados estadísticamente con un ANOVA seguidos de la prueba Duncan.

*Microarreglos:* El análisis de los microarreglos indica que la CST induce una matriz de expresión de genes diferente a la observada después de la administración de salina, en las dos estructuras analizadas, puente e hipocampo. En el hipocampo, la CST induce un incremento significativo en la expresión de genes que codifican para la enzima Asp-ARNt- sintetasa, Fosfolipasa C delta 4, Glutation peroxidasa, Superoxido dismutasa 3, proteína de unión a calmodulina asociada a vesículas y Sinaptofisina, comparado con salina; en contraste disminuye significativamente la expresión de genes



que codifican para la Citocromo P-450 comparado con el grupo control (los resultados fueron analizados con una prueba-t,  $p < 0.05$ ) (Tabla 1).

Gen	Intensidad normalizada		Cortistatina vs Salina %
	Salina	Cortistatina	
Asp-RNA <sub>t</sub> sintetasa	0.887	1.014	14.3
Hormona de Crecimiento/ receptor leucotrieno B	0.855	0.975	14.0
Fosfolipasa C delta-4	0.898	1.005	11.8
Glutación peroxidasa	0.897	0.986	10.0
Superoxido dismutasa 3	0.946	1.023	8.1
Proteína unión-Calmodulina	0.938	1.001	6.8
Sinaptofisina	0.935	0.995	6.4
Citocromo P-450	1.049	0.991	-5.5

Tabla1 Efecto de la CST sobre la expresión de genes en el hipocampo. En esta tabla se observa el porcentaje de cambio que indujo la CST en el hipocampo, (-) se refiere a una disminución en la expresión del gen.

\* Todas las comparaciones son significativamente diferentes a una  $p < 0.05$ , basados en una prueba-t

Mientras que, en el puente la CST induce una disminución significativa en la expresión de los genes que codifican para la proteína DORA (Down Regulated by Activation), fosfolipasa C beta 4, glutación sintetasa y citocromo C oxidase comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ , basados en un una prueba-t) (Tabla 2).



Gen	Intensidad normalizada		Cortistatina vs Salina %
	Salina	Cortistatina	
Proteína DORA	1.0171	0.9284	-8.8
Fosfolipasa C beta 4	1.0111	0.9268	-8.4
Glutation sintetasa	1.0196	0.9639	-5.5
Citocromo C oxidasa	0.9564	0.9122	-4.4

Tabla 2 Efecto de la CST sobre la expresión de genes en el puente. En esta tabla se observa el porcentaje de cambio que indujo la CST en los genes del puente, (-) se refiere a una disminución en la expresión del gen.

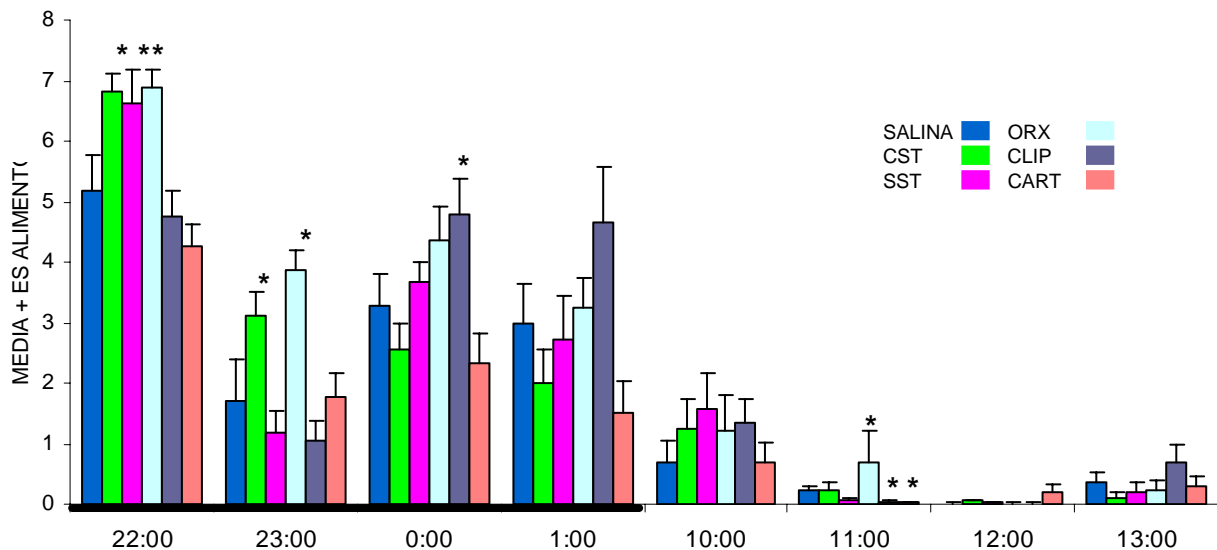
\*Todas las comparaciones son significativamente diferentes a una  $p < 0.05$ , basados en una prueba-t

Algunos otros genes también cambiaron significativamente en ambas estructuras sin embargo su función no está aún definida, por tal motivo consideramos innecesario mostrarlos. El resto de los genes evaluados permanecieron sin cambios significativos.

*Ingesta de alimento:* Las ratas consumen más alimento durante su periodo de actividad (en la oscuridad), comparado con el periodo de luz; principalmente en durante las 4 horas primeras horas de oscuridad, como se puede observar en la gráfica 10. La administración del tratamiento correspondiente (salina, cortistatina, CST; somatostatina, SST; orexina, ORX; péptido del lóbulo intermedio semejante a corticotropina, CLIP; regulador de la transcripción de cocaína y amfetamina, CART) antes del cambio de luz en ambos puntos muestra lo siguiente: durante el periodo de oscuridad, la CST, SST y ORX incrementan significativamente la ingesta respecto al control ( $p < 0.05$ ). Este



incremento persiste en la segunda hora bajo el efecto de la CST. En la hora 3 de evaluación, CLIP incrementa significativamente la ingesta de alimento. Mientras que en la contraparte del ciclo, durante la primera hora se observan tendencias a un incremento, pero no son significativas. En la segunda hora posterior al encendido de luz, ORX induce un incremento en la ingesta de alimento, mientras que en esta misma hora CLIP y CART provocan una disminución significativa respecto al control. El resto de las horas permanece sin cambio. (Gráfica 11).

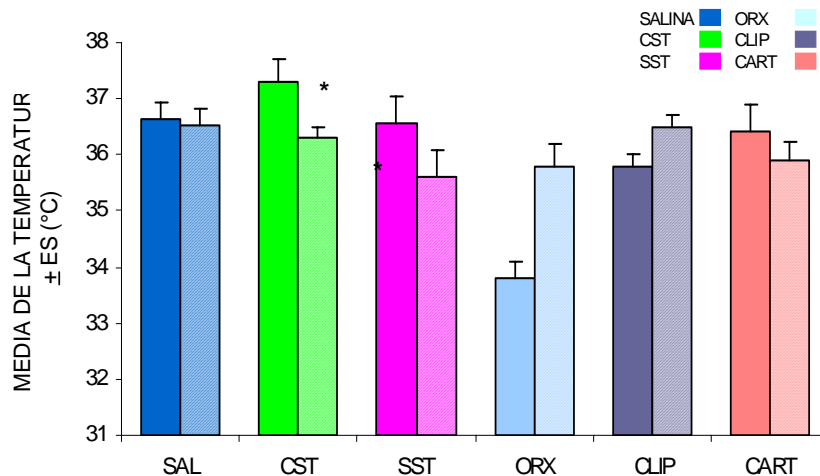


Gráfica 11. Efecto de CST, SST, ORX, CLIP y CART sobre la ingesta de alimento en ambas partes del ciclo luz oscuridad, durante las 4 horas posteriores al cambio de luz. La barra negra representa la fase de oscuridad. \* $p < 0.05$ , basados en un ANOVA seguida de la prueba Duncan.

*Temperatura corporal:* El registro de la temperatura corporal a los 30 y 240 min después de la administración del tratamiento correspondiente muestra que, ORX y CLIP



disminuyen significativamente la temperatura respecto al control, únicamente 30 min después de su administración. Mientras que a los 240 de la administración, la SST disminuye significativamente la temperatura corporal (Gráfica 12).



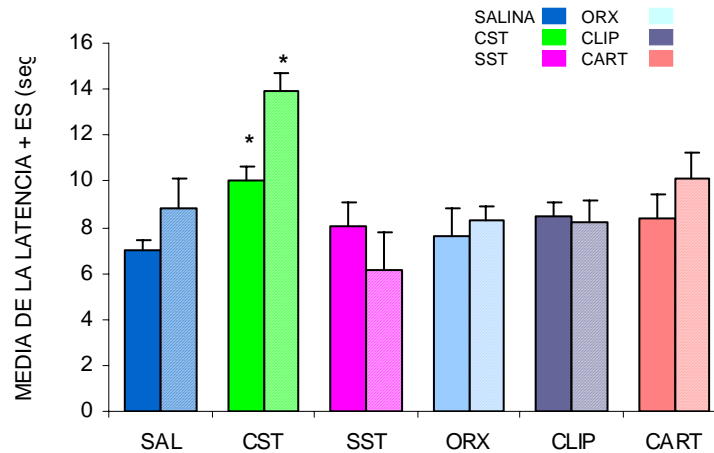
Gráfica 12. Temperatura corporal. Las barras de colores sólidos muestran el efecto de los diferentes péptidos sobre la temperatura corporal administrados 30 minutos antes de la determinación, mientras que las barras achuradas muestran la determinación 240 min. después de la administración. Las barras azul-oscuro corresponden a salina, las verdes a CST, las rosas a SST, las azul claro a ORX, las moradas a CLIP y las naranjas a CART. \* $p < 0.005$ , utilizando la prueba de Duncan.

*Analgesia:* En este experimento, inicialmente observamos que el grupo que recibió salina muestra variaciones diurnas en la respuesta al dolor, como ya se había reportado previamente (Gráfica 13).

El análisis de los resultados, muestra que únicamente la CST incrementa la latencia de respuesta de manera significativa respecto al grupo control, tanto a los 30



min. como a los 240 min. después de su administración ( $*p < 0.05$ ) en base a la prueba de Duncan.



Gráfica 13. Analgesia. Efecto de la administración de salina, CST, SST, ORX, CLIP y CART sobre la respuesta al dolor utilizando el modelo del Hot Plate. Se realizaron dos determinaciones, a los 30 y a los 240 min después de la administración del tratamiento. El eje de las abscisas muestra la latencia (min) de respuesta. Las barras de colores sólidos representan los resultados de la determinación 30 min después de la administración, y las barras achuradas la latencia a los 240 min del tratamiento.  $* < p < 0.05$ , basados en un prueba de Duncan.





## DISCUSION

Se ha reportado que la mayoría de los procesos fisiológicos de los seres vivos se expresan con variaciones rítmicas a lo largo del día, de tal forma que el ciclo sueño-vigilia, la actividad motora, la temperatura corporal, la secreción de hormonas, péptidos, expresión de receptores, genes etc., manifiestan variaciones en su expresión (Díaz-Muñoz, 1999; Aguilar-Roblero y Escobar, 2000; Benstaali y cols, 2001, Rönnbäck y cols, 2005). Los procesos cognoscitivos no son una excepción, diversos autores han reportado que el aprendizaje y la evocación de la memoria muestran variaciones diurnas en humanos (Monk y col 1997, Antoniadis y cols, 2000; Arechiga, 2000; Albretch y Oster, 2001; Bemelmans y cols, 2003, Dijk y von Schantz, 2005) y diversas especies animales (Chaudhury y Colwell, 2002, Deurveilher y Semba, 2005). Por ejemplo, Holloway y Wansley demostraron que en la rata, la evocación de la prevención pasiva mostraba variaciones diurnas (Holloway y Wansley, 1973). Consistentemente con estos reportes, nuestros resultados muestran que tanto la evocación de la memoria, como la actividad motora, el ciclo sueño-vigila y la concentración de AMPc se expresan diferencialmente a lo largo de las 24 horas.

Los resultados de las variaciones diurnas de la evocación de la memoria utilizando el LB, revelan que las ratas previamente entrenadas resuelven eficientemente la prueba a lo largo del ciclo luz-oscuridad. Sin embargo, ejecutan mejor durante la fase de oscuridad. Por ejemplo, durante el periodo de oscuridad, las ratas resuelven el laberinto en menor tiempo y simultáneamente utilizan preferentemente la estrategia espacial. En cambio durante el periodo de luz del ciclo, estas mismas ratas, además de



tardar más tiempo en resolver el laberinto, utilizan más frecuentemente la estrategia serial (ver gráfica 2). Es importante resaltar que nuestros resultados del análisis del ciclo sueño-vigilia, muestran que durante el periodo de oscuridad del ciclo, predomina la vigilia; mientras que en la luz hay una mayor expresión de sueño.

Estos resultados sugieren que cuando las ratas se mantienen en vigilia por periodos largos (en la oscuridad), son más eficientes, obviamente, bajo la interpretación de que conseguir el reforzador en el menor tiempo y utilizar una estrategia (serial o espacial) significa mayor eficiencia. De hecho, diversos autores ya han sugerido que durante la vigilia las pruebas cognoscitivas se resuelven con menos errores en humanos y en otras especies (Dijk y Schantz, 2005, ver figura 8). Por ejemplo, Monk y cols (1997) han mostrado que la eficiencia para resolver distintas tareas sigue un ciclo circadiano relacionado al estado de alerta en humanos, quienes muestran una mayor capacidad de ejecución en las primeras horas del día, la cual disminuye conforme avanza la tarde (Monk y cols, 1997).

Consistente con estos resultados, Higuchi y cols (2000) reportaron que el indicador electrofisiológico de las funciones cognoscitivas, evocado por estímulos auditivos, la P300, tiene variaciones diurnas; demostrando que la latencia de aparición de la onda P300 tiene una correlación positiva con la somnolencia y una correlación negativa con el nivel de atención. La P300 es considerada una medida de actividad neuroeléctrica relacionada a las funciones cognoscitivas tales como atención y procesamiento de información, de tal forma que estos resultados sugieren que a las



horas del día en las que expresamos vigilia (en los humanos durante la luz y en los roedores durante la oscuridad), la atención y el procesamiento de información se llevan a cabo con mayor eficiencia. Esta eficiencia se ha asociado a un incremento en liberación de ACh hipocampal durante el periodo de vigilia en roedores (Mizuno y cols; 1994, Sei y cols, 2003).

Adicionalmente, observamos que la coordinación motora medida con la viga de equilibrio, muestra variaciones diurnas. Cabe señalar que estas ratas primero fueron sometidas al entrenamiento para resolver la prueba y posteriormente analizamos las potenciales variaciones en el tiempo de ejecución. Encontramos que la rata resuelve la prueba en menos tiempo durante la fase de oscuridad del ciclo. Estos resultados sugieren que la coordinación motora y equilibrio necesarios para resolver esta prueba, están relacionados con el estado de alerta (ver grafica 8). Nuestros resultados coinciden con algunos reportes que sugieren que la actividad motora de diversas especies se expresa con variaciones diurnas (Benstaali y cols; 2001).

Aunque ya se había sugerido que la cortistatina (CST) participaba en la consolidación y evocación de la memoria (Sánchez-Alavez y cols, 2000; Flood y cols, 1997); no se había explorado la posibilidad de que este efecto tuviera variaciones diurnas. Para llevar a cabo este objetivo evaluamos el efecto de la administración icv de la CST sobre la evocación de la memoria, en dos puntos representativos de cada parte del fotoperiodo. Observamos que este neuropéptido incrementa el tiempo que tardan las ratas en resolver la prueba en ambos puntos del ciclo. Es importante mencionar que



durante la fase de luz el incremento en el tiempo tiene una magnitud del 25% del tiempo de su respectivo control, mientras que en la fase de oscuridad este incremento alcanza una magnitud del 100%. Por otro lado, observamos que la administración de la CST provoca que las ratas cambien la estrategia que originalmente utilizaban para resolver el LB. Por ejemplo, a las 13:00 p.m., el uso de la estrategia serial disminuye aproximadamente en un 20% de la expresión de la estrategia serial que utiliza el grupo control, mientras que el porcentaje de ratas que utiliza la resolución aleatoria no cambia. Es interesante señalar que el uso de la estrategia espacial se incrementa un 20% respecto al uso en el grupo control. Mientras que en la contraparte del ciclo (01:00 a.m.), la administración de la CST provoca una disminución de aproximadamente el 20% en el uso de la estrategia serial comparando contra el grupo control e incrementa el porcentaje de la resolución al azar en la misma magnitud. No cambia el porcentaje de ratas que resuelven utilizando la estrategia espacial. Como podemos observar, el porcentaje de ratas que emplea la estrategia espacial para resolver la prueba no se ve afectado, incluso se favorece el uso de la misma durante la fase de luz.

Estos resultados sugieren que la CST exógena no afecta la memoria espacial de la rata en esta prueba. En cambio, la estrategia serial, si se ve deteriorada en ambas partes del ciclo. Simultáneamente la administración de la CST provoca un incremento en el número de errores y perseverancias cometidas durante la resolución de la tarea. Estos resultados sugieren que el efecto de la CST se limita al tipo de memoria que utiliza la rata cuando ejecuta la estrategia serial, que puede ser la memoria de procedimientos o la memoria de trabajo. Cabe señalar que la administración de la CST



en este experimento fue icv, por lo que es posible que este efecto sea consecuencia de su interacción con las estructuras relacionadas con este tipo de memoria como el núcleo caudado o la corteza prefrontal. Por ejemplo, se ha reportado que las ratas con el núcleo caudado lesionado tienen alteraciones en la localización egocéntrica que les impide resolver laberintos radiales (De Coteau y Kesner, 2000). De Coteau y Kesner (2000), demostraron que las ratas con lesiones en el núcleo caudado, no tienen la habilidad para resolver un laberinto radial en una modalidad que utiliza la memoria de procedimiento (serial), sin embargo, sí lo resuelven en la modalidad que utiliza la memoria declarativa (espacial). Los pacientes con enfermedad de Parkinson con lesiones en el neostriado y la corteza prefrontal, muestran deterioro selectivo de la memoria de procedimiento mientras mantienen intacta la memoria declarativa (Saint-Cyr y cols, 1998). Se ha reportado que sujetos con lesiones en la corteza prefrontal tienen deteriorada la memoria de procedimiento y la memoria de trabajo. Se ha observado que la corteza prefrontal incrementa su actividad durante la realización de pruebas que requieren el uso de la memoria de trabajo (Dick y Katsuyuki, 2004, Ross y Eichenbaum; 2006). Posiblemente el efecto de la CST no sea específico sobre una tarea declarativa (espacial) debido al tipo de administración; así es que consideramos que la administración local (hipocampo) del péptido nos revelaría si la CST afecta la memoria espacial.

La administración intrahipocampal de la CST resultó en un incremento del tiempo necesario para resolver el laberinto, tanto a las 13:00 p.m. como a la 01:00 a.m. Sin embargo, los errores y las perseverancias se incrementan únicamente a la 01:00



a.m. A las 13:00 p.m. la administración de la CST favorece la solución del laberinto al azar, disminuyendo el uso de la estrategia serial, de nuevo el uso de la estrategia espacial no cambia. Mientras que a la 01:00 a.m., la administración de la CST disminuye el uso de la estrategia serial y espacial, favoreciendo por lo tanto la resolución al azar. Estos resultados sugieren que la administración intrahipocampal de la CST deteriora la memoria de tipo espacial durante la fase de oscuridad del ciclo. Estos resultados son apoyados en el reciente artículo publicado por de Tallent y cols, en el cual muestra que los ratones transgénicos que sobrepresan CST muestran deteriorada la memoria espacial, evaluada en el LB (Tallent y cols, 2005). Adicionalmente sugieren que la administración de la CST afecta la actividad hipocampal. Se ha reportado ampliamente que el hipocampo es una estructura importante en la memoria espacial, particularmente en los roedores (Burgess, 2002; Burger y cols, 2006). Por ejemplo, ratones con lesiones citotóxicas en el hipocampo son incapaces de resolver pruebas espaciales como el "paddling pool", que es una prueba que combina los elementos del laberinto de Morris y los del LB (Deacon y Rawlins, 2002). Se ha reportado que los ratones que sintetizan en el hipocampo una forma modificada de CaMKII-independiente de  $Ca^{2+}$  por la introducción de un aspartato en el aminoácido 286, tienen deteriorada la memoria espacial. Según Bach y cols (1995), cuando éstos ratones transgénicos son entrenados para resolver el LB, no aprenden a utilizar las señales espaciales y resuelven el laberinto de manera aleatoria (Bach y cols, 1995). Se ha reportado también que las ratas sometidas a estrés crónico muestran deficiencias para aprender a resolver tareas espaciales asociados a cambios en las concentraciones hipocampales de los ARN mensajeros de CaMKII, CaM, CREB (Sun y



cols, 2006), de esta forma se sugiere la integridad del hipocampo es indispensable para que se lleven a cabo eficientemente los procesos de memoria y aprendizaje.

Estos resultados apoyan las sugerencias de diversos autores, respecto a el efecto de las sustancias y la hora del día en el cual son administradas, la presencia de un ritmo endógeno en la disposición de los sistemas que regulan el efecto de dichas sustancias ha sido discutido (Aréchiga, 2000, Bunce y cols, 2004). Recientemente se ha reportado que la expresión de genes en la rata, inducida por la exposición a medio ambiente enriquecido y por lo tanto genes involucrados en la regulación de los procesos cognoscitivos, como el NGFI (factor de crecimiento neuronal I) alfa y beta sigue variaciones diurnas, mostrando su máxima expresión en las horas de oscuridad, es decir cuando las ratas tienen su periodo de mayor actividad (Rönnbäck y cols, 2006). El conocimiento de estas variaciones diurnas nos permite predecir en que momento del día encontraremos el efecto esperado y apoya la existencia de los ritmos diurnos de los procesos cognoscitivos.

Por otro lado, sabemos que las pruebas de control motor son necesarias cuando se realizan tareas cognoscitivas, ya que nos aseguran que en un determinado momento, la deficiencia en la ejecución no es una incapacidad de movimiento, que puede ser mal interpretada como problema cognoscitivo. Nosotros realizamos un par de pruebas que miden la coordinación motora, la viga de equilibrio y el Rota Rod. En el caso particular de la viga de equilibrio, encontramos que la administración de la CST durante el periodo de luz del ciclo, interfiere con la actividad motora, ya que produce un



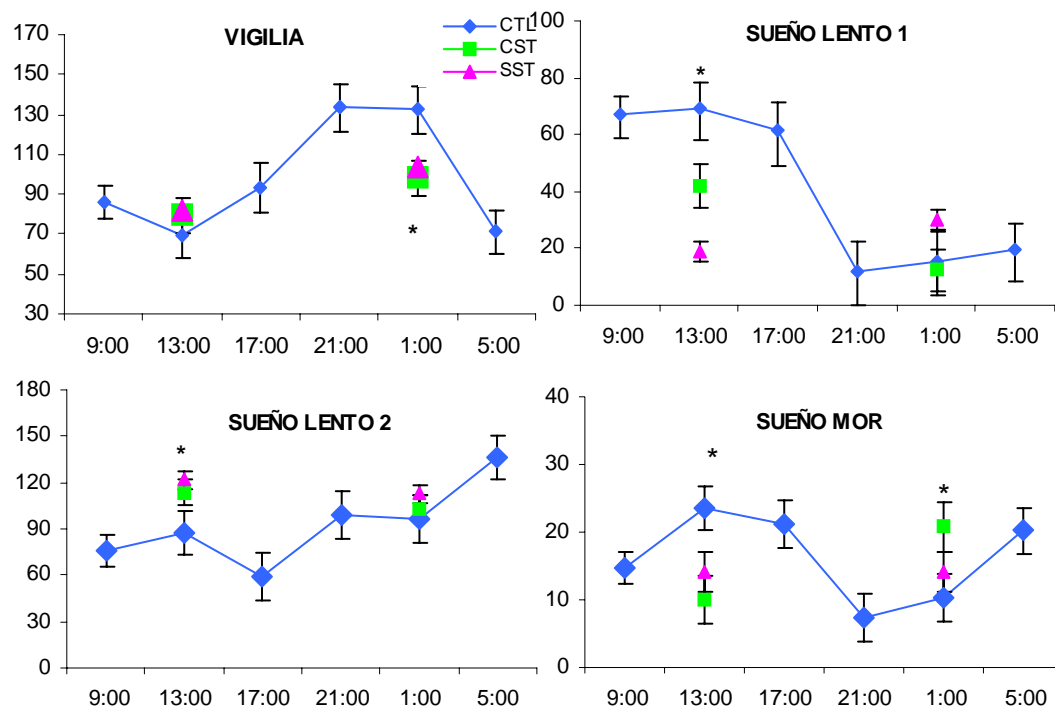
incremento en el tiempo que tardan las ratas para recorrer la viga. Este resultado sugiere que la administración icv de la CST deteriora el control motor durante la fase de luz, pero no la motivación y el equilibrio necesarios para resolver la prueba, ya que todas las ratas recorren la viga sin caerse, sólo utilizan más tiempo para resolver la prueba. Este efecto sobre la actividad motora, potencialmente puede interferir con el incremento en el tiempo para la ejecución en el LB. Sin embargo, cuando evaluamos si la CST interfiere con la coordinación motora durante la fase de oscuridad utilizando ambas pruebas, la viga de equilibrio y el Rota Rod, no observamos el mismo efecto. El efecto de la cortistatina sobre la coordinación motora no interfiere con la ejecución de los procesos cognoscitivos.

Desconocemos el mecanismo a través del cual la CST deteriora el control motor durante la fase de luz. Sin embargo, podría deberse a un efecto directo sobre los núcleos cerebrales que regulan el movimiento, como los núcleos de la base o la corteza motora. Cabe señalar que el modelo de la viga de equilibrio, fue originalmente diseñado (Drucker-Colín y García-Hernández, 1991) para evaluar la función del estriado. Es posible que la CST interactúe con las sustancias que regulan la actividad del estriado como ACh o GABA y de esta forma afectar el control motor. Este deterioro sobre el control motor provocado por cortistatina sólo ocurre durante la fase de luz del ciclo, por lo cual suponemos que estos sistemas de regulación (ACh, GABA) poseen un ritmo diurno que los hace sensibles en un determinado momento a la CST.





**Sueño:** El análisis de los resultados obtenidos del efecto de la cortistatina y la somatostatina sobre el sueño, muestran que durante la fase de luz del ciclo la cortistatina disminuye significativa el SMOR (13:00 hrs., CTL  $23.58 \pm 3.27$  min vs. CST  $9.97 \pm 7.67$  min). Cuando es administrada en la fase de oscuridad, disminuye la V (01:00 hrs. CTL  $132.3 \pm 12.2$  vs. CST  $98.02 \pm 11.6$ ) y provoca un incremento significativo del SMOR (01:00 hrs., CTL  $10.35 \pm 3.58$  vs. CST  $20.78 \pm 3.27$  min). La somatostatina disminuye significativamente la vigilia a la 01:00, a las 13:00 disminuye el sueño lento 1 y el SMOR. Para todos los casos con una  $p < 0.05$ , basados una prueba de ANOVA seguida la prueba de Duncan, ver gráfica 9.



Gráfica 9. Efecto de CST sobre el ciclo sueño-vigilia. El eje de las ordenadas representa la media del tiempo total en minutos ( $\pm$  ES), el eje de las abscisas representa la hora del día a la cual inicio cada uno de los registros de sueño. (\* $p < 0.05$ , ambos tratamientos comparados con el grupo control).



Por otro lado, sugerimos que el efecto de la CST sobre los procesos cognoscitivos no sólo ocurre a través de la disminución de la actividad eléctrica neuronal (de Lecea y cols, 1996); también es consecuencia de una modulación intracelular. De tal forma que analizamos si la CST modula la concentración de AMPc, el cual inicia una cascada de segunda mensajería subyacente a los procesos cognoscitivos. De hecho, existen reportes previos que sugieren que la CST modifica la concentración de este segundo mensajero (de Lecea et al 1996, Sánchez-Alavez et al, 2000). La CST disminuye la producción AMPc en el hipocampo a la 01:00 y a las 13:00 horas. Se ha reportado en diversos modelos (moluscos, moscas, roedores) la importancia del AMPc en los procesos cognoscitivos. Por ejemplo, la desregulación de AMPc, en el mutante de drosophila *rutabaga*, o en el mutante *dunce*, se relaciona con un deterioro en la memoria (Silva<sub>b</sub> y cols, 1998, Renger y cols, 2000, Lee y O'Dowd, 2000). Adicionalmente, se ha reportado que la vía de señalización molecular que sigue la síntesis de AMPc (PKA-CREB-genes de expresión temprana-genes de expresión tardía-proteínas) es requerida para la evocación (Barros y cols, 2000) y la consolidación de la memoria (Izquierdo y cols, 2000).

En este contexto, sugerimos que el deterioro en la evocación de la memoria que produce la CST, puede ser también una consecuencia de la desregulación de la producción de AMPc en el hipocampo. Por otro lado, encontramos que la producción de AMPc en el hipocampo ocurre con variaciones diurnas, mostrando un pico de concentración a la 01:00 a.m., lo cual corresponde al momento de mejor ejecución de la rata en el LB. Comparativamente, a las 13:00 p.m. la concentración de AMPc es menor,



y corresponde con una ejecución menos eficiente (más tiempo, más errores, 10 % de utilización de la estrategia aleatoria). De tal forma que la disminución en la eficiencia de la ratas para resolver el laberinto parece una consecuencia de una menor concentración de AMPc, como ya se ha reportado (Mayford y Kandel, 1999; Nguyen y Kandel, 2000; Renger y cols, 2000).

Este resultado sugiere que la CST ha tenido que unirse a un receptor y a través de esta interacción modificar la cascada de señalización intracelular relacionada con los procesos cognoscitivos. De hecho, se ha sugerido que la CST se une a los receptores para SST, preferentemente el sst2A (Sieler y cols, 1998; Liu y cols, 2005) y recientemente Robas y cols (2003) sugirió que la CST posee un receptor propio el cual se expresa en el hipocampo.

Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otros sistemas de señalización y de transmisión puedan ser afectados por la administración de la CST. Por ejemplo, es posible que la CST module la actividad colinérgica y de esta forma regular dichos procesos. de Lecea y cols (1996) han mostrado que la CST inhibe la actividad colinérgica en el hipocampo, por tanto, es posible que éste neuropéptido deteriore la evocación de la memoria, a través de la interacción con ACh. Ya se ha demostrado que la inhibición colinérgica inhibe la consolidación y la evocación de la memoria (Prado-Alcalá y cols, 1994 Silva<sub>a</sub> y cols, 1998; Shinoe y cols, 2005; Giovannini y cols, 2005, Frielingsdorf y cols, 2006). Otra posibilidad es que su efecto puede llevarse a cabo sobre las neuronas noradrenérgicas del LC ya que Connors y cols (1997) han



reportado que la CST provoca una inhibición de la actividad de estas neuronas. Se sabe que el LC es un núcleo que facilita los estados de alerta y atención. Se ha reportado que durante procesos que requieren atención las neuronas de éste núcleo incrementan su frecuencia de disparo (Aston-Jones y cols, 1999, 2005). Entonces la disminución de la actividad de las neuronas de éste núcleo puede relacionarse con una disminución del estado de alerta y atención, ambos importantes para los procesos cognoscitivos.

Probablemente, la CST afecta la evocación de la memoria y el aprendizaje, a través de la modulación del estado de alerta. De hecho, sabemos que la CST modifica la expresión del ciclo sueño-vigilia. Nuestros resultados muestran que durante la fase de oscuridad del ciclo (01:00 a.m.), donde el efecto sobre el deterioro de la memoria es más evidente porque no está contaminado por el deterioro del control motor, la CST incrementa el sueño MOR y disminuye significativamente la vigilia (ver gráfica 8). Cabe señalar que durante esta fase del ciclo, este tipo de roedores expresan predominantemente vigilia y tienen menos expresión de sueño (ver gráfica 8). De tal forma que, durante este periodo del ciclo de luz-oscuridad el efecto de la CST sobre el deterioro de la memoria puede deberse también a una disminución del estado de alerta. Cabe señalar que en la contraparte del ciclo, donde la CST también deteriora la memoria, disminuye la expresión del SMOR, pero no incrementa la vigilia.

Aunque ya se había reportado que la administración de la CST incrementa el sueño lento dos (de Lecea y cols, 1996), nuestros resultados del incremento de la



misma fase de sueño no alcanzaron significancia. Adicionalmente, de Lecea y cols, (1996) no reportan el efecto de la CST en la fase de oscuridad del ciclo. En este sentido, nuestra contribución, es describir las variaciones diurnas del efecto de la CST sobre el ciclo sueño-vigilia.

Cortistatina y Genes. Genes que aumentan su expresión. La administración icv de la CST modifica la matriz de expresión de varios genes en el hipocampo, comparado con el grupo control (ver tabla 1). Por ejemplo, el gen de la enzima Asp-ARNt sintetasa se incrementa un 14%. Se sabe que esta enzima cataliza la unión covalente de aminoácidos al ARNt durante el primer paso de la biosíntesis de proteínas (Hamamieh y Yang, 2001). Esta enzima podría facilitar la síntesis de proteínas necesarias para la consolidación de la memoria (Nihei y cols, 2001). El gene de la Fosfolipasa C delta 4 se incremento un 12%. La actividad de esta enzima es dependiente de receptores muscarínicos entre otros (Mayford y Kandel, 1999), y se sabe que cataboliza la reacción de fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP2) a diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3); consecuentemente incrementa el  $Ca^{++}$  citoplásmico (May y cols; 1999). Este incremento en el  $Ca^{++}$  activa al DAG y a la proteína cinasa C (PKC), ambos involucrados en la consolidación de la memoria (Wallenstein y cols, 2002; Neill y cols, 2001). Dos genes involucrados en la regulación de la liberación de los neurotransmisores (King y Arendash, 2002), también fueron incrementados por la CST. Uno de ellos codifica para la proteína de unión a calmodulina asociada a vesículas y el otro para la sinaptofisina. Se ha reportado que la proteína de unión a calmodulina asociada a vesículas interactúa con la sinaptofisina 1 para facilitar la migración de las vesículas a la membrana



presináptica; y se ha postulado a la sinaptofisina como el poro a través del cual el neurotransmisor es liberado (Janz y cols; 1999; Turner y cols; 1999). De esta forma, la expresión de ambos genes puede estar relacionada con la neurotransmisión. Otros tres genes que fueron afectados por la administración de la CST, codifican para la síntesis de proteínas involucradas en la regulación de especies reactivas a oxígeno (ROS). Estos son: -glutation peroxidasa (GP), superóxido dismutasa (SD) y citocromo P-450 (CYP)-. El Glutation reducido es oxidado por la GP con la concomitante reducción de  $H_2O_2$  como respuesta contra el estrés oxidativo (Kimura y cols; 1998, Oxenkrug y cols, 2001). La SD reduce los niveles de ROS mientras que la CYP los incrementa (Beckman y Ames, 1998). La CST incrementa la expresión de la GP y de la SD mientras reduce la expresión de la CYP, lo cual sugiere en total un efecto de reducción de la generación de ROS. No sabemos si la potencial disminución de ROS esta jugando un papel relevante en el efecto que hemos observado de la CST sobre la memoria; sin embargo, se ha reportado que la presencia de ROS deteriora la memoria (Rivas-Arancibia y cols, 2000).

Genes que disminuyen su expresión. Adicionalmente, utilizamos el puente de las mismas ratas para analizar la expresión de genes bajo el efecto de la administración de la CST. Observamos que, la matriz de expresión de genes en el puente bajo el efecto de la CST es diferente comparado con la matriz de expresión de genes en el hipocampo, lo cual sugiere un efecto núcleo específico. Por ejemplo, el gen que codifica para la expresión de la proteína DORA disminuye su expresión casi un 9 %. DORA es una proteína que pertenece a la familia de las inmunoglobulinas (IgSF), su cDNA se encuentra principalmente en células dendríticas inmaduras, monocitos y macrófagos.



Se sugiere que tiene un papel importante en la recaptura de antígenos, funcionando como un co-receptor en el complejo antígeno-anticuerpo, o como una molécula involucrada en la recirculación de células dendríticas (Bates EE, 1998). No se ha descrito si esta proteína está involucrada en la regulación del ciclo sueño-vigilia.

El gen de la fosfolipasa C beta 4 disminuye su expresión un 8 %. Se sabe que las beta isoformas de esta enzima median las señales del receptor de glutamato m1, el cual es crucial para la modulación de la transmisión sináptica y plasticidad (Hashimoto K, 2001). Adicionalmente se ha reportado que la activación del receptor 2A para serotonina, 5-HT<sub>2A</sub> acoplado a una G proteína incrementa el Ca<sup>++</sup> intracelular vía la activación de la fosfolipasa C. En el sistema nervioso estos receptores están involucrados en la regulación del sueño y el estado de alerta. Cabe la posibilidad de que la CST esté afectando este mecanismo intracelular y de esta forma disminuir la expresión de sueño MOR durante la fase de oscuridad.

Adicionalmente, observamos que la administración de la CST disminuye la expresión de dos genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo. Uno de ellos es el gen de la glutatión sintetasa, el cual disminuye el 5 %. Esta enzima cataliza la síntesis del glutatión (Matsuda, 1996), el cual está involucrado en la protección celular contra los radicales libres. El otro gen que cambia su expresión es el que codifica la síntesis de la Citocromo C oxidasa, el cual disminuye el 4 %. Esta enzima se ha involucrado en la regulación de la fosforilación oxidativa; manteniendo el equilibrio en la formación de ROS (Sarkela y cols; 2000). Ramanathan y cols (2002) han reportado que



la privación de sueño altera la expresión de enzimas antioxidantes y por lo tanto el metabolismo de ROS. La administración de la CST disminuye la expresión de dos genes involucrados en la regulación del estrés oxidativo, así como la expresión de SOL 2 y sueño MOR, cabe la posibilidad que la CST afecte la expresión de sueño a través de la interacción con ROS. Sin embargo hacen falta más experimentos para demostrarlo.

El efecto de la CST sobre la expresión de genes fue evaluada 4 horas posteriores a su administración; por lo tanto, decidimos evaluar el efecto de la CST en la memoria cuatro horas después de la administración; y de esta forma verificar si el cambio en la expresión de genes se reflejaba en la conducta, demostrando un efecto compensatorio al deterioro que produce a los 30 min. Puesto que todos los genes que cambiaron su expresión bajo el efecto de la CST en el hipocampo están relacionados con el mejoramiento de los procesos cognoscitivos, suponíamos que en este momento la CST mejoraría la ejecución de la rata en el LB.

De esta forma analizamos el efecto de la administración de la CST sobre el aprendizaje, a los 30 o 240 min de su administración icv. Al analizar los resultados encontramos que la CST deteriora el aprendizaje de la rata, tanto a los 30 min como a los 240 min después de su administración. En ambos casos incrementan el tiempo, el número de errores y las perseverancias cometidas por la rata durante la adquisición. Comparando ambas gráficas con sus respectivos controles la CST incrementa el tiempo





que tarda la rata en aprender a resolver el laberinto, ya que en la última sesión de entrenamiento, las ratas empiezan a mejorar su ejecución.

Las estrategias que emplean para resolver el laberinto también se ven afectadas a los 30 y 240 min de la administración de la CST. A los 30 min el porcentaje (100%) de ratas que emplea el azar para resolver el laberinto va disminuyendo más lentamente que el control conforme ocurren los entrenamientos, y casi desaparece en la última sesión, donde las ratas resuelven principalmente de forma serial, comparadas con su control que resuelve principalmente de forma espacial. En cambio, 240 min después de la administración de la CST, las ratas resuelven el laberinto, incluso al final de los entrenamientos preferentemente de forma aleatoria, comparado con su control que utiliza preferentemente estrategia espacial. Estos resultados sugieren que el efecto de la administración de la CST permanece aún a los 240 min y afecta la elección de la estrategia empleada de una forma más evidente en este momento.

Los resultados en la expresión de genes en el hipocampo, parecen estar en conflicto con los resultados conductuales que encontramos a los 240 min; al menos en parte por ejemplo, a la que involucra a los genes que regulan la liberación de los neurotransmisores este efecto pudiese estar restringido a células inhibitorias, como las GABAérgicas.



Finalmente podemos concluir que la CST juega un papel importante en la modulación de los procesos cognoscitivos, de la misma forma que se ha reportado para otras sustancias que actualmente se consideran moduladores endógenos de estos procesos.

Cortistatina e ingesta de alimento. Otra conducta que evaluamos bajo el efecto de la CST fue la ingesta de alimento (IA) al momento del cambio de luz, en ambos puntos del ciclo. En este experimento administramos adicionalmente SST, ORX, CLIP y CART a diferentes grupos. Encontramos que durante la fase de oscuridad, es decir cuando la rata expresa su mayor cantidad de vigilia; la CST, SST y ORX incrementan la ingesta de alimento, una hora después de la administración. Este efecto se mantiene hasta la segunda hora bajo el efecto de la CST y ORX. Mientras que a la tercera hora post-administración, CLIP incrementa la IA. En nuestras manos, la administración de CART disminuye la IA, sin embargo no alcanza significancia. En la contraparte del ciclo, que es el momento del día en el que las ratas ingieren menos alimento y pasan el tiempo preferentemente en alguna fase de sueño, no se observa ningún cambio en la IA, una hora después de la inyección. Para la segunda hora post-administración, observamos que ORX, incrementa la IA; mientras que CLIP y CART la disminuyen. La IA no sufre modificaciones el resto de las horas evaluadas. El efecto sobre la IA de ORX había sido demostrado previamente (Szekely y cols; 2002; Monda; 2003) y confirmamos el efecto de CART, únicamente en la fase de luz del ciclo (Aja y cols; 2002, Hillebrand y cols, 2002).



Estos resultados nos sugieren varias cosas, la primera de ellas, es que la CST, un péptido modulador del sueño y de la memoria, participa en la regulación de la IA. Aunque los experimentos realizados nos impiden describir un mecanismo de acción a través del cual la administración de la CST incrementa la IA, con base en los mecanismos conocidos que regulan esta conducta, proponemos que la CST participa en esta regulación de la misma forma en que lo hacen otros péptidos conocidos como ORX, NPY. Es decir a través de una interacción hipotalámica, probablemente uniéndose a los receptores de SST, los cuales se expresan en el hipotálamo (Reisine y Bell, 1995); o a los propios, considerando que Robas y cols (2003), sugieren la existencia del receptor para la CST en el hipotálamo.

La ingesta de alimento depende de la integración de factores metabólicos, autonómicos, endocrinos y medioambientales, coordinados con un apropiado estado de alerta. Se ha sugerido, que el hipotálamo participa de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis de la energía, mediante la integración de estos factores y coordinando la respuesta conductual (Willie y Chemelli, 2001; Cupples, 2002; Hillebrand; 2002). En mamíferos, las neuronas del hipotálamo lateral son importantes para la ingesta de alimento y el estado de alerta. Por ejemplo, se ha reportado que los animales con lesiones en esta área sufren hipofagia y un decremento en el estado de alerta. Por otro lado, se ha reportado que el hipotálamo lateral tiene proyecciones a lo largo del sistema nervioso central y se encuentra anatómicamente dispuesto de tal forma que puede coordinar procesos metabólicos, motivacionales, motores, autonómicos y de alerta, para producir las condiciones adecuadas para llevar a cabo la



ingesta de alimento en el individuo (Cupples, 2002; Hillebrand; 2002). Adicionalmente, existe una gran cantidad de neuropéptidos, involucrados en la regulación de la IA. Por ejemplo, los péptidos que favorecen la IA u orexigénicos: NPY, AgRP, MCH, ORX y los que disminuyen la IA o anoréxicos como:  $\alpha$ -MSH, leptina, CART, CCK. Posiblemente, existen muchos otros mediadores que aún no están identificados (Hillebrand y cols; 2002).

Estos resultados no permiten proponer a la CST como uno de estos mediadores que regulan la IA, el cual además podríamos clasificar entre los péptidos que regulan tanto el ciclo sueño-vigilia, como la IA, de la misma forma como lo hacen ORX, CCK, NPY lo que apoya la hipótesis de que una de las funciones del sueño es la regulación de la energía (Prospéro-García y Méndez-Díaz, 2004).

Adicionalmente observamos que la CST incrementa el umbral al dolor, tanto a los 30 como a los 240 min después de la inyección (Méndez-Díaz y cols; 2004). Esta prueba en particular requiere de un sistema motor íntegro, ya que la forma de responder es a través del movimiento para alejarse del estímulo nocivo. Descartamos la posibilidad de un deterioro motor con la prueba del RR; la cual fue realizada también 30 y 240 min después de la administración de la CST. En esta prueba comparamos el efecto de la CST con el de SST, ORX, CLIP y CART y encontramos que únicamente la CST afecta la respuesta al dolor. Considerando entonces que el efecto de la CST es diferente al que produce la SST (Capasso y Loizz, 2002; Tsai y cols; 2001), sugerimos



que este efecto no ocurre a través de los receptores de SST, sino que potencialmente es consecuencia de la activación de los receptores propios (Robas, 2003).

Por otro lado, se sabe que la ACh induce analgesia (Hartvig y cols, 1989; Ghelardini, y cols, 2000) y que la CST antagoniza los efectos de la ACh. Por lo tanto, esperaríamos que la CST incrementara la percepción al dolor. Sin embargo, observamos que también la CST produce analgesia. Estos resultados sugieren que este efecto no ocurre a través de la interacción con ACh. Aunque todavía no sabemos el sitio en el cual la CST ejerce su acción, este puede incluir al hipocampo. La inactivación de esta estructura disminuye la percepción del dolor (McKenna y Melzac; 1992). Por ejemplo, la administración intrahipocampal de antagonistas del receptor NMDA o agonistas GABAérgicos produce analgesia (McKenna y Melzac; 2001, Zarrindast y Mahmoudi; 2001). Puesto que la CST inhibe a las células principales del hipocampo (de Lecea y cols, 1996), sugerimos que el efecto analgésico es consecuencia de esta inhibición hipocampal. Sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que la CST interactúe con otros sistemas que regulan el dolor como los péptidos opioides (Inturrisi, 2002), la serotonina (Vogel y cols; 2003) y los endocannabinoides (anandamida y oleamida) (Piomelli y cols; 2000; Murillo-Rodríguez y cols; 2001) en otras áreas del sistema nervioso central. En conclusión podemos decir que la CST esta involucrada en la modulación de la percepción al dolor.

Adicionalmente encontramos en este mismo experimento, que la latencia de respuesta al dolor del grupo control se incrementa significativamente cuando es



evaluada a los 240 min (16:30 hrs) de la administración del vehículo cuando es comparada con la prueba a los 30 min (13:30 hrs) después de la administración del mismo. Este resultado puede deberse a un efecto de las variaciones diurnas en la respuesta al dolor, como ya se ha sugerido previamente (Konecka y Sroczyńska, 1998).

Diversos autores han reportado que el sistema colinérgico juega un papel muy importante en la regulación de la temperatura corporal. Por ejemplo, la activación colinérgica disminuye la temperatura corporal en ratas (Simonic y cols; 1988; Takahashi y cols; 2001).

Considerando que la CST tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad colinérgica (de Lecea y cols 1996), esperábamos que la CST al inhibir la actividad colinérgica, provocara un incremento en la temperatura corporal. Sin embargo, nuestros resultados muestran que a los 30 min la CST, no afecta significativamente la temperatura corporal, por lo tanto sugerimos que la CST no está involucrada en la regulación de la temperatura. En cambio, observamos que la SST disminuye significativamente la temperatura. De hecho, ya se había reportado previamente que la SST atenúa la hipertermia (Kappel y cols; 1998), de tal forma que nuestros datos confirman el papel de la SST en la regulación de la temperatura. Por otro lado, encontramos que la administración de ORX disminuye significativamente la temperatura comparada con el grupo control, regresando a los valores normales 240 min después. Los reportes al respecto son controvertidos, puesto que ambos efectos han sido reportados (Jazberenyi y cols, 2002; Székely y cols; 2002; Monda y cols, 2003).



Probablemente el efecto de la ORX sobre la temperatura sea dosis dependiente. De cualquier forma nuestros datos apoyan el la idea que ORX participa en la termorregulación.

En la mayoría de los experimentos (memoria, ciclo sueño-vigilia, AMPc, IA, analgesia, temperatura corporal) hemos comparado el efecto de la CST con el de SST. En todos los casos, el efecto de ambos péptidos es diferente. Probablemente algunos efectos de la CST ocurran a través de la activación de los receptores para SST, sin embargo el hecho de tener diferentes efectos biológicos, favorece la hipótesis de la existencia de un receptor propio. Robas (2003) sugiere la existencia de receptores para la CST (MrgX2) en el hipocampo, sustancia negra, el hipotálamo y el puente y una amplia distribución del péptido en todo el cerebro, principalmente en la corteza cerebral. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que existan otros receptores para la CST, ni que la CST utilice los receptores para SST, los cuales están ampliamente distribuidos en todo el cerebro y son activados por la CST y de esta forma la CST ejerza su efecto. De hecho, estas características van de acuerdo con la variedad de efectos que tiene la CST. Sin embargo, independientemente de la vía que utilice la CST para ejercer su efecto, ya sea en los procesos cognoscitivos, el ciclo sueño-vigilia, la respuesta al dolor o la IA, éstos son de considerable importancia.



## Conclusiones

El efecto de la administración de la cortistatina tiene variaciones diurnas sobre la elección de la estrategia para resolver el laberinto de Barnes. La administración icv en fase de oscuridad del ciclo, afecta la utilización de la estrategia serial (memoria trabajando o de procedimientos). Mientras que la administración intrahipocampal de la cortistatina deteriora la memoria espacial en la misma fase del ciclo. Aparentemente durante la fase de luz el efecto de la cortistatina sobre la memoria es menos severo. Podemos correlacionar el efecto de la cortistatina sobre la memoria con un efecto sobre la actividad intracelular del hipocampo, pues encontramos que este neuropéptido disminuye la producción AMPc. La cortistatina exógena afecta la expresión del estado de alerta; incrementa la expresión del sueño MOR, durante la fase de oscuridad del ciclo. La cortistatina afecta la matriz de expresión de genes del hipocampo involucrados en la regulación de los procesos de la memoria; mientras que en el puente afecta la expresión de genes que se han involucrado en la regulación del sueño. Con base a estos resultados proponemos a la cortistatina como un modulador de los procesos cognoscitivos a través de la interacción con los fenómenos conductuales que regulan la expresión de los mismos.

La cortistatina es un modulador dentro del sistema nervioso central que interacciona con diversos núcleos cerebrales regulando funciones importantes para la supervivencia como la memoria, el sueño y la ingestión de alimento y otras funciones autonómicas como la analgesia y la temperatura corporal.





## **ANEXOS**

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación fueron enviados y aceptados para su publicación en revistas de difusión internacional. Un artículo más se encuentra actualmente en proceso de revisión. Una copia de cada uno de ellos se encuentra en esta apartado.



## Cortistatin, a modulatory peptide of sleep and memory, induces analgesia in rats

Mónica Méndez-Díaz, Marcela Guevara-Martínez, Cynthia R. Alquicira, Khalil Guzmán Vásquez, Oscar Prospéro-García\*

Grupo de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, Mexico D.F. 04510, Mexico

Received 28 July 2003; received in revised form 8 October 2003; accepted 8 October 2003

### Abstract

Cortistatin is a neuropeptide structurally related to somatostatin that induces sleep and interferes with the memory process. Very likely affecting other neurotransmission systems, such as: acetylcholine,  $\gamma$ -aminobutyric acid, and noradrenaline. For example, cortistatin inhibits acetylcholine excitatory actions in the hippocampus. It is known that acetylcholine is involved in the regulation of several processes, such as pain, temperature, sleep, and memory. Since cortistatin seems to interact with acetylcholine, we decided to explore whether cortistatin participates in the system that modulates the noxious stimulus-evoked behavior. The intracerebroventricular administration of cortistatin increased the threshold to evoke a defensive behavior by a nociceptive stimulus. These observations suggest that cortistatin is part of the system that regulates pain perception.

© 2003 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Cortistatin; Pain; Hot plate; Hippocampus; Diurnal variation; Motor control

The system that modulates pain perception utilizes several neurotransmitters, such as acetylcholine (ACh),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), and glutamate. For example, cholinomimetic drugs [4,6], GABAergic agonists [5,15,18], and the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists attenuate pain-evoked behavior [12]. Additionally, some peptides, such as somatostatin, increase the threshold to respond to noxious stimuli [2]. The opioid peptides are pain relievers [1,7] and other substances, such as endocannabinoids, are also involved in pain modulation [13,14].

Cortistatin (CST) is a neuropeptide that has structural homology with somatostatin (SST) [9,16]. The mRNA of CST is localized exclusively within the cerebral cortex and the hippocampus in neurons that also contain GAD<sub>67</sub> [9]. Studies *in vitro* have shown that CST has inhibitory effects on the hippocampal activity apparently via antagonizing the excitatory effects of ACh [9], indicating that CST is, as much as ACh, a neuromodulator in the mnemonic system. In this context, we assessed whether CST is a neurotrans-

mitter in the systems modulating pain evoked behavioral response. To reach this goal, we evaluated the effect of CST on pain threshold by using the hot plate task. Additionally, the motor control of rats receiving CST was evaluated to discard that the effect on pain threshold was contaminated by an effect on this activity. Additional peptides, such as somatostatin, orexin, corticotropin-like intermediate lobe peptide, and cocaine- and amphetamine-regulated transcript, were used as controls to determine the specificity of CST's effect. These peptides, with exception of cocaine- and amphetamine-regulated transcript, also affect the sleep-waking cycle.

A total of 42 male Wistar rats (250–300 g) were used in this experiment. The animals were housed individually with access to food and water *ad libitum*. They were maintained under constant temperature and a controlled light/dark cycle (22 °C, 52% humidity, and 12:12-h light/dark cycle; lights on at 08:00 h). Anesthesia was induced with 5% and maintained with 2–3% of halothane while a guide cannula aimed to the lateral ventricle ( $P = 0.8$ ,  $L = 1.5$ , and  $V = 3.6$ ) was implanted. After the recovery period (at least 1 week) rats were randomly assigned to one of the following groups: vehicle (saline, 5  $\mu$ l), cortistatin (CST)

\* Corresponding author. Tel.: +52-55-623-2509; fax: +52-55-623-2241.  
E-mail address: [opg@servidor.unam.mx](mailto:opg@servidor.unam.mx) (O. Prospéro-García).



(Phoenix Pharmaceuticals Inc., CA), somatostatin (SST) (Sigma, St. Louis, MO), orexin-A (ORX) (American Peptide, CA), corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) (Peninsula Laboratories Inc., CA) and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) (Bachem, CA). These peptides were administered intracerebroventricularly (i.c.v.) with the aid of a Kd Scientific pump at a rate of 1  $\mu$ l/min through an injector inserted into the guide cannula and protruding 1 mm. The dose of all used peptides was 0.3 nmol, administered always at 01:00 h.

The pain perception test was performed using a Hot Plate device (Soerel, model DS35). This apparatus consists of a stainless steel plate (25  $\times$  25 cm) that can be heated and maintained at a constant temperature. The plate was set at 55  $^{\circ}$ C. Rats were placed on the plate and restricted of movement by a Plexiglas cylinder (20 cm diameter and 20 cm height). The time elapsed from the moment the rat was placed on the plate to the time the rat started to lick its hind paw was recorded. Each rat was tested 30 and 240 min after peptide administration.

The motor control was evaluated through two tasks, the Drucker Beam (DB) and the Ugo Basile's Rota Rod (RR). The DB consists of five wooden beams of different widths (24, 18, 12, 6, and 3 mm), 2 m long, placed on two pedestals that allow an inclination of 15 $^{\circ}$  [3]. In this task, a rat is trained to walk on the 2-m long, 3-mm wide, wooden beam, in order to reach its home cage. To get to its cage, a rat has to have motivation and a fine control of balance and posture. This training is accomplished by sequential trials on successively thinner beams. Once the animals performed this task in less than 1 min, we considered the rat to be trained and proceeded to evaluate the effect of CST.

The RR consists of central drums on which the subjects are positioned during a test. Opaque disks separate these drums, in such a way that the four rats tested simultaneously cannot distract one another. Each lane has its own digital timer. The time from the beginning of the experiment to the time when the rat fell off on a switch that turned the timer off was computed. The speed of the rod rotation increases progressively (this model has six speeds). The rod rotation speed increases progressively until reaching a maximum speed of 15 revolutions per minute. Thirty minutes after the administration of CST, rats were tested on the RR. They started with 1 min without RR motion, followed by 1 min at each speed, to end with four periods of 1 min each at the highest speed.

At the end of the experiment, these rats were anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg). Once the rats were under deep anesthesia, they were perfused transcardially with 150 ml of phosphate-buffered saline followed by 150 ml of 4% paraformaldehyde solution. The brains were prepared for histological analysis with cresyl violet stain to verify the cannula placement.

Statistical significance was obtained by using an analysis of variance test and pos hoc least significant difference test.

Results show that CST increased the pain threshold, at

both tested times (30 and 240 min after the i.c.v. injection) as compared to the vehicle (Fig. 1). Due to the fact that only CST affects the pain perception we decided to evaluate its effects on the motor control. Results indicate that CST did not affect the motor control in both tasks DB and RR, 30 min after the administration (Table 1).

These results support the notion that CST modulates pain perception, since it is capable of increasing pain threshold at 30 and 240 min after its administration. Since the Hot Plate task evaluation requires movements from the rat to reduce the discomfort and CST increases the latency to actually perform a movement, it is likely that CST is rather affecting motor control than pain perception. Therefore, we performed two types of tests to assess motor coordination, i.e. the RR and the DB task. CST did not affect any of them. Additionally, these data suggest that the analgesic effect of CST may last for several hours, at least four, which was the longest time tested.

Since CST is producing an effect different from the one caused by SST (basically SST has no effect), we infer that CST effects are mediated by non-SST receptors, potentially binding to its own receptors. On the other hand, since ACh induces analgesia [4] and CST antagonizes ACh effects [9], we expected that CST would increase pain perception. Surprisingly CST, like ACh, induces analgesia. These results compel us to suggest that the effect of CST on pain perception is not by interacting with ACh.

Although we do not know the actual brain system on which CST exerts its action, it may include the hippocampus. The inactivation of this structure reduces pain perception [11]. For example, both NMDA antagonists and GABA agonists administered into the hippocampus produce analgesia [10,12]. Both effects may be a result of inhibiting pyramidal cells. Since CST hyperpolarizes pyramidal cells in the hippocampus, we suggest that the analgesic effect induced by this peptide is a consequence of this hippocampal cells inhibition. In addition, CST coexists with GABA in

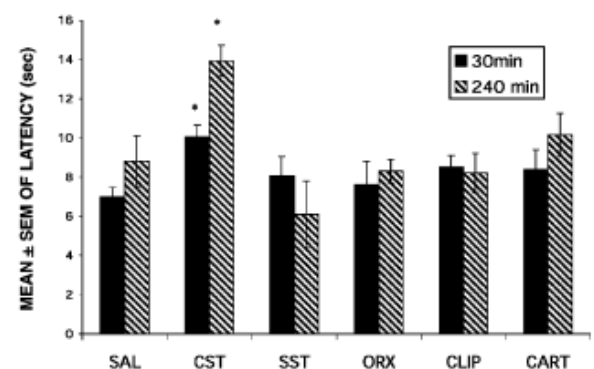


Fig. 1. CST-induced hypoalgesia. Effect of i.c.v. administration of saline, cortistatin (CST), somatostatin (SST), orexin (ORX), corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP), or cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) on pain perception, using the Hot Plate task. Open columns represent the latency at 30 min after administration and filled columns the latency at 240 min after administration. \* $P < 0.05$ .



**Table 1**  
Effect of i.c.v. administration of saline or CST on motor control on Drucker Beam and Rota Rod tests, 30 min after administration

	Drucker Beam	Rota Rod
Saline	12.6 ± 1.2	55.2 ± 1.7
CST	13.6 ± 2.1	54.4 ± 2.1

Results are expressed as mean ± S.E.M. of the total time in seconds. No statistical significance was detected.

the hippocampus [9] and inhibits the pyramidal cells [9], further supporting the potential action of CST on the hippocampus.

Alternatively, CST may be interacting with other molecules that regulate pain, such as the opioid peptides [1], serotonin [17], and endocannabinoids (anandamide, oleamide) [13,14] in other areas of the central nervous system. On the other hand, we found that, in the vehicle group, the latency to respond in the Hot Plate test increased significantly when evaluated at 240 min as compared to the test at 30 min after i.c.v. administration. This may be an effect of diurnal variations as suggested elsewhere [8].

In conclusion, we can say that CST plays a role in the modulation of pain perception.

#### Acknowledgements

This study was partially supported by CONACyT, Grant No. 25488 to O.P.G.

#### References

[1] R.J. Bodnar, M.M. Hadjimarou, Endogenous opiates and behavior, *Peptides* 23 (2002) 2307–2365.  
 [2] A. Capasso, A. Loizz, Effects of cysteamine on nociception in mice, *Acta Pharmacol. Sin.* 22 (2001) 603–608.  
 [3] R. Drucker-Colín, F. García-Hernández, A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function, *J. Neurosci. Methods* 39 (1991) 153–161.

[4] C. Ghelardini, N. Galeotti, A. Bartolini, Loss of muscarinic antinociception by antisense inhibition of M1 receptors, *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000) 1633–1640.  
 [5] A.K. Gilbert, K.B. Franklin, GABAergic modulation of descending inhibition systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits, *Pain* 90 (2001) 25–36.  
 [6] P. Hartvig, P.G. Gillberg, T. Gordh Jr, C. Post, Cholinergic mechanisms in pain and analgesia, *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* (1989) 75–79.  
 [7] C.E. Inturrisi, Clinical pharmacology of opioids for pain, *Clin. J. Pain* 18 (2002) S3–S13.  
 [8] A.M. Konecka, I. Sroczynska, Circadian rhythm of pain in male mice, *Gen. Pharmacol.* 31 (1998) 809–810.  
 [9] L. de Lecea, J.R. Criado, O. Prospéro-García, K.M. Gautvik, P.J.G. Schweitzer, P.E. Danielson, C.L.M. Dunlop, G.R. Siggins, S.J. Henriksen, J.G. Sutcliffe, A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties, *Nature* 381 (1996) 242–245.  
 [10] J. Ma, B. Shen, L.S. Stewart, I.A. Herrick, L.S. Leung, The septohippocampal system participates in general anesthesia, *J. Neurosci.* 22 (2002) RC200.  
 [11] J.E. McKenna, R. Melzack, Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus, *Pain* 49 (1992) 105–112.  
 [12] J.E. McKenna, R. Melzack, Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test, *Exp. Neurol.* 172 (2001) 92–99.  
 [13] E. Murillo-Rodríguez, M. Giordano, R. Cabeza, S.J. Henriksen, M. Méndez-Díaz, L. Navarro, O. Prospéro-García, Oleamide modulates memory in rats, *Neurosci. Lett.* 313 (2001) 61–64.  
 [14] D. Piomelli, A. Giuffrida, A. Calignano, F. Rodríguez de Fonseca, The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 218–224.  
 [15] V. Schuler, C. Lüscher, C. Blanchet, Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA responses in mice lacking GABA(B1), *Neuron* 31 (2001) 47–58.  
 [16] A.D. Spier, L. de Lecea, Cortistatin: a member of somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions, *Brain Res.* 33 (2000) 228–241.  
 [17] C. Vogel, R. Mossner, M. Gerlach, T. Heinemann, D.L. Riederer, K.P. Lesch, C. Sommer, Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter deficient mice, *J. Neurosci.* 23 (2003) 708–715.  
 [18] M.R. Zarrindast, M. Mahmoudi, GABA mechanisms and antinociception in mice with ligated sciatic nerve, *Pharmacol. Toxicol.* 89 (2001) 79–84.



## Cortistatin modulates memory evocation in rats

Mónica Méndez-Díaz<sup>a</sup>, Louis Irwin<sup>b</sup>, Margarita Gómez-Chavarrín<sup>a</sup>, Anabel Jiménez-Anguiano<sup>c</sup>,  
Rafael Cabeza<sup>b</sup>, Eric Murillo-Rodríguez<sup>a</sup>, Oscar Prospéro-García<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-250, México, D.F. 04510, México

<sup>b</sup>Department of Biological Sciences, The University of Texas, El Paso, El Paso TX, USA

<sup>c</sup>Depto. de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F. México, México

Received 8 July 2004; received in revised form 18 October 2004; accepted 28 October 2004

Available online 8 December 2004

### Abstract

The neurochemical control of learning depends on several neurotransmitters, hormones, and neuropeptides. Cortistatin is a neuropeptide with sleep-modulating properties that regulates memory consolidation and evocation. Several reports have suggested that learning processes are expressed under diurnal variations; therefore, it seems that the efficiency to solve learning tasks is related to the arousal state. Although we know that cortistatin modulates learning, we do not know whether its effect is subjected to diurnal variations. Hence, we evaluated memory evocation and the sleep–waking cycle along the day. Additionally, we evaluated the effect of cortistatin on motor control and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentration. Performance of rats was better at 01:00 h than at 13:00 h to solve the Barnes maze. Cortistatin impaired memory evocation, increased rapid-eye-movement (REM) sleep, and decreased wakefulness at 01:00 h, whereas increasing it at 13:00 h. Cortistatin blunts cAMP concentration and impairs motor control at 13:00 h. These results support further a cortistatin modulatory role in the memory process.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cortistatin; Circadian rhythm; Sleep–waking cycle; Memory evocation; cAMP

### 1. Introduction

The learning process has been conventionally divided for its study in acquisition, consolidation, and evocation. We believe that memory evocation is fundamental to maintain the individual physical and mental integrity, because past events recall is crucial for the display of survival strategies. Studies of the brain structures involved in the regulation of these processes have shown that the hippocampus plays an important role in memory evocation (Riedel et al., 1999; Szapiro et al., 2002). Additionally, several studies support the notion that evocation of memory is not as efficient at every hour of the day. Quite the contrary, it undergoes fluctuations throughout the day (Antoniadis et al., 2000; Chaudhury and Colwell, 2002;

Monk, 1994) in tight association to the arousal state. On the other hand, several neurotransmitters regulate memory consolidation and evocation, among them glutamate (Abel and Matthew Lattal, 2001; Szapiro et al., 2002), acetylcholine (Hasselmo et al., 1996; Murai et al., 1995), noradrenaline (Barros et al., 2001; Szapiro et al., 2002), serotonin (Barros et al., 2001; Szapiro et al., 2002), and gamma-amino-butyric-acid (Hasselmo et al., 1996). In addition, neuropeptides (Bennett et al., 1997; Telegdy and Adamik, 2002) and proteins play a role in the modulation of memory consolidation, since protein-synthesis-inhibiting drugs impair it (Vianna et al., 2001). Furthermore, several molecules involved in intracellular signaling also play a role in memory processes, for example the second messenger, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), is involved in one of the main signaling pathways of memory consolidation (Mayford and Kandel, 1999; Nguyen and Kandel, 2000; Renger et al., 2000), and memory evocation (Abel and Matthew Lattal, 2001; Szapiro et al., 2002).

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 5623 2509; fax: +52 55 5623 2241.

E-mail address: [opg@servidor.unam.mx](mailto:opg@servidor.unam.mx) (O. Prospéro-García).



Recently, the neuropeptide cortistatin has been involved in learning processes. Cortistatin is expressed in gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic neurons of the cerebral cortex and the hippocampus (de Lecea et al., 1996, 1997). This peptide decreases neuronal excitability in hippocampal slices and in the hippocampus of anesthetized rats. Likewise, it inhibits acetylcholine excitatory actions in the cerebral cortex and the hippocampus (de Lecea et al., 1996). It also impairs memory consolidation in a passive avoidance paradigm, when injected into the hippocampus of freely moving rats (de Lecea et al., 1997) and mice (Flood et al., 1997). Cortistatin also alters the production of cAMP in cultures of hippocampal cells (Sánchez-Alavez et al., 2000).

To further enhance our understanding on cortistatin's role in learning processes, we studied its effects on the performance of trained rats to solve the Barnes circular maze (Barnes, 1979) that rats solve using spatial or procedural strategies. One major focus in our study was to analyze the degree at which circadian rhythms may affect this behavior (Antoniadis et al., 2000; Monk, 1994). Therefore, we evaluated the efficiency of rats to solve the maze throughout the day and based on this observation we selected representative time-points of each phase of the dark–light cycle (13:00 and 01:00 h) to analyze the effect of cortistatin. Likewise, the arousal state was determined by evaluating the sleep–waking cycle of rats and analyzing the effect of cortistatin at both time-points. Motor control was evaluated along the 24 h, and the effect of cortistatin on motor activity was tested at 01:00 and 13:00 h, to determine whether the effect of cortistatin is on mnemonic processes or on locomotion. Furthermore, since cortistatin affects cAMP metabolism (de Lecea et al., 1996; Sánchez-Alavez et al., 2000) we measured hippocampal cAMP generation along the 24 h and determined the effect of cortistatin on the concentration of this molecule at 01:00 and 13:00 h. The overall goal of this study was to document a potential role of cortistatin in the regulation of learning processes and, in particular, of memory evocation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Forty-three male Wistar rats (250–350 g), were implanted with a guide cannula aimed at the right lateral ventricle ( $A=0.8$ ;  $L=1.5$ ;  $V=3.6$ ). Additionally, 24 male Wistar rats (250–350 g) were implanted with a set of electrodes for conventional sleep recordings and a guide cannula aimed at the lateral ventricle. Rats were anesthetized with Halothane (2–5%). After surgery, all rats were housed individually and maintained under constant temperature and a controlled light–dark cycle ( $22\pm 1$  °C, and 12/12 light–dark cycle, lights on at 08:00 h). Water and food (Rat Chow, Purina) were available ad libitum. One week was allowed for recovery. At the day of the experiment, all rats

were injected with either vehicle (saline, 5  $\mu$ l) or cortistatin (500 ng/5  $\mu$ l) (Phoenix Pharmaceuticals, CA). Rats were intracerebroventricularly (i.c.v.) injected with the aid of a KD Scientific pump at a rate of 1  $\mu$ l/min through an injector inserted into the guide cannula. The used dose of cortistatin has been shown to affect memory processes in other studies (Sánchez-Alavez et al., 2000). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in this study. Guidelines and requirements stipulated by the ethics committee of our Faculty of Medicine at the UNAM were fully fulfilled.

### 2.2. Barnes circular maze

The Barnes maze is a validated test often used for the assessment of spatial memory in rodents. We used a modification of the one originally described by Barnes (Barnes, 1979). Our maze consists of a 150-cm-diameter and 3.5-cm-thick circular wooden disc, 90 cm high. Forty holes, 7-cm diameter, were equidistantly located around the perimeter and centered 5 cm from it. A black wooden escape tunnel (10 $\times$ 10 $\times$ 30 cm) was placed beneath one hole, selected randomly for each rat. The maze is placed in a 4 $\times$ 4 m room with white-light illumination and white walls, which has several spatial cues. One speaker to deliver a buzzing sound (90 dB) is located 1 m above the center of the maze affixed to the room's ceiling. A video camera was used to videotape the task for its off-line analysis. The buzzing sound and ambient light were used as aversive stimuli.

### 2.3. Barnes maze solution

To solve this maze, rats start by looking for the escape tunnel randomly and then switch to one of two strategies—spatial or sequential—according to the training progress. In the spatial strategy, rats seem to use cues located in the room to orient themselves in the maze and to elect the right direction toward the escape tunnel. In this situation, the cues are the room's door, the video system and several pictures on one of the walls. Rats often make the mistake of exploring one or two holes adjacent to the target one. However, we still consider that they are using a spatial strategy. In the sequential strategy, rats choose one hole, which can even be the farthest one (20 holes) from the target and, from there, they start exploring every single hole sequentially until they reach the escape tunnel. This means that the spatial cues are not taken into account by the rats to find the target. In addition to the strategy, we also recorded the number of non-target holes explored (errors), the number of visits to previously explored holes (perseverances), and the total time to solve the maze.

### 2.4. Training

Forty-two rats were trained to solve the Barnes maze during four successive days at 09:00 h. Each session (one



everyday) consisted of four trials, for a total of 16 trials in 4 days. On the first trial, rats were placed into the escape tunnel for 1 min. At the end of this time, rats were placed on the center of the Barnes maze within a cylindrical opaque chamber and a buzzing sound (90 dB) was delivered. Rats remained in this chamber for 10 s, and then were set free to explore the maze and find the escape tunnel. The trial ended once the rat entered the escape tunnel or once 4 min had elapsed. When the rat entered into the escape tunnel the buzzer was turned off and the rat was allowed to stay in the tunnel for 1 min. The escape tunnel was always located beneath a located in the same spatial position although the hole changed since the Barnes maze was rotated. The spatial location was selected randomly for each rat at the beginning of training.

### 2.5. Test

Upon completion of the initial training, 10 rats were evaluated at different time points of the day—09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, 05:00 h—for three consecutive days to determine whether their performance would differ as a result

of diurnal variations. It is noteworthy to mention that during the dark phase of the cycle, rats were evaluated with lights on, this way we offered the rats the opportunity to use spatial cues at any time. The rest of the rats were divided into two groups and received (i.c.v.) either saline ( $n=18$ ) or cortistatin ( $n=14$ ) 30 min prior to one trial session during the light phase (13:00 h) and one trial session during the dark phase (01:00 h). We used these time points because they are representative of each phase of the light–dark cycle (see Fig. 2).

Statistical significance was determined through one-way analysis of variance (ANOVA) and a Student–Newman–Keuls post-hoc test. Significance was accepted at  $P<0.05$ .

### 2.6. Sleep

For sleep recordings, the rats were acclimated to the recording conditions for 24 h before sleep was recorded. Rats were i.c.v. injected with saline and then recordings were made at same time points of the day—09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, 05:00 h—to determine the sleep–waking cycle, the recordings lasted for 4 h. Once the diurnal

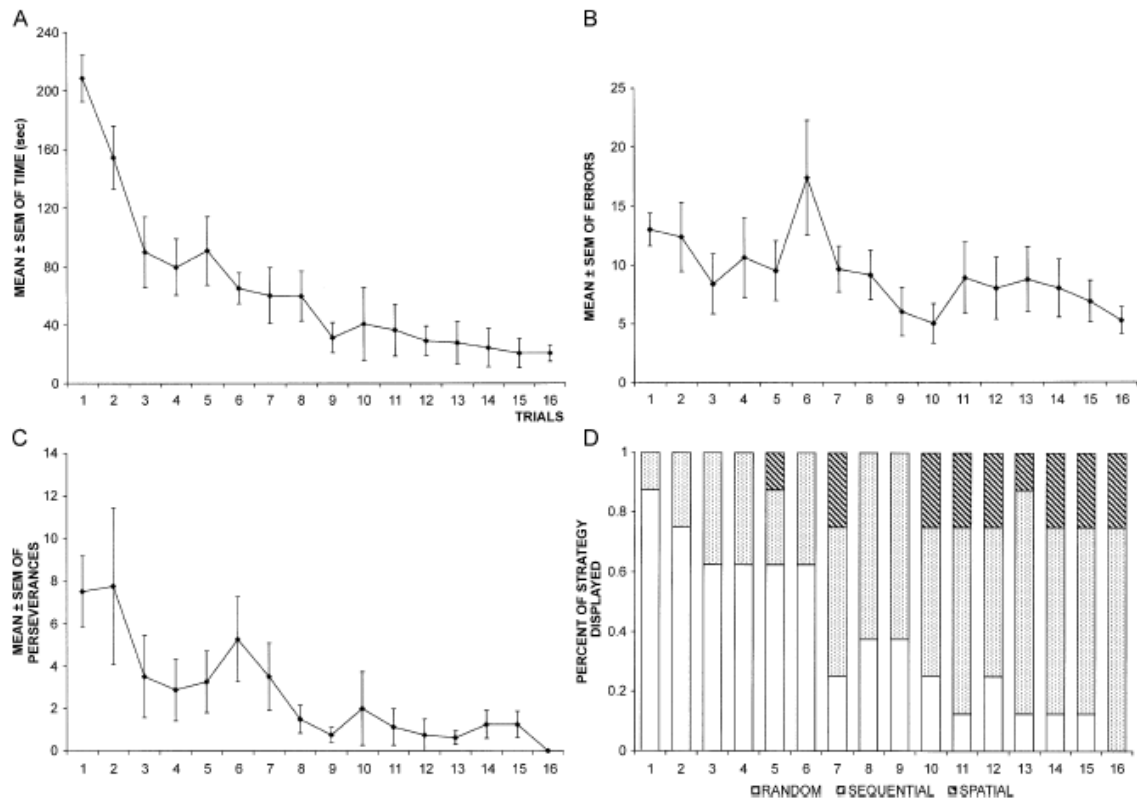


Fig. 1. Illustration of the rat's performance in the Barnes maze along 16 trials. (A) Learning curve, (B) errors, (C) perseverances and (D) strategies. As it can be seen at the end of the training, rats solve the Barnes maze with great proficiency: time, errors and perseverances decreased. All rats used one of the two (spatial or sequential) strategies at the end of the training period. At this time, we considered that the rats were trained to solve the maze ( $P<0.05$ ).



variations of the sleep–waking cycle were determined, we used the two representative time points of the light–dark cycle (01:00 and 13:00 h) to analyze the effect of cortistatin. Sleep recordings were scored visually and analyzed with the HYPNOS program.

Statistical significance was assessed by means of one-way analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Duncan test. Significance was accepted at  $P < 0.05$ .

### 2.7. cAMP

A total of 30 rats without manipulation were used in this part of our study to determine the hippocampal concentration of cAMP. Eighteen of them were killed by decapitation and the hippocampus was collected immediately. Rats were killed along the 24 h at the same time-points used for the Barnes maze and sleep recordings (three rats per point). The tissue was frozen and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for less than a week until analyzed. The last 12 rats were killed at 13:00 and 01:00 h, six rats per point, the hippocampus was collected and incubated for 1 h with saline or cortistatin; thereafter, the tissue was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until used. For cAMP determination, the tissue was thawed and homogenized with trichloroacetic acid (6% w/v), then centrifuged at  $2000 \times g/15$  min and the soluble phase was collected and washed with a diethyl-ether saturated solution. The final volume was lyophilized at  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . cAMP was measured with the enzyme-immunoassay Amersham Kit (Amersham Pharmacia Biotech, NJ), following the manufacturer's instruction. Samples or standards are added to individual wells of a camp immunoassay plate followed by 100  $\mu\text{l}$  of anti-cAMP immunoglobuline G (IgG). After 2 h of incubation at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the plates are thoroughly washed and bound IgG is measured via 1 h incubation with an anti-IgG peroxidase conjugated secondary antibody (50  $\mu\text{l}$  per well). The enzymatic activity was measured by incubating with 150  $\mu\text{l}$  of 3,3',5,5', tetramethylbenzidine at room temperature. Reaction is quantified in an ELISA reader at 450 nm and the cAMP concentration was determined as the inverse of B/Bo percentage expressed in fmol. The optical density (OD) was converted into percentage of binding, using the following percentage equation:  $\%B/Bo = OD \text{ sample} / NSB/OD \text{ of Bo} \times 100$ , where NSB is the non-specific binding and Bo the binding without cAMP. Once a standard calibration curve depicting  $\%B/Bo$  was obtained, the concentration of cAMP was derived from it.

Statistical significance was determined using one-way ANOVA and a Student–Newman–Keuls post-hoc test. Significance was accepted at  $P < 0.05$ .

### 2.8. Drucker beam

This apparatus consists of five wooden beams of different widths (24, 18, 12, 6, and 3 mm), 2 m long, placed on two pedestals that allow a  $15^{\circ}$  inclination Drucker-Colín and García-Hernández, 1991.

### 2.9. Training

In this task, a rat is trained to walk on the 2 m long, 3 mm wide, wooden beam, in order to reach its home-cage. To get to its cage, the rat must be motivated and must have a fine control of balance and posture. This training is accomplished by sequential trials on successively thinner beams. Once the animals performed this task in less than a minute, we considered the rat to be trained and we proceeded to evaluate the diurnal variation of its performance.

### 2.10. Test

Rats were divided into two groups: saline ( $n=6$  rats) and cortistatin ( $n=5$  rats). Their performance on the Drucker beam was evaluated for 3 days at the same time-points used for the other procedures. Once the diurnal variations in this task were determined, we evaluated the performance at 13:00 and 01:00 h under saline or cortistatin, injected 30 min before each test.

Statistical significance was determined through one-way ANOVA and a Student–Newman–Keuls post-hoc test. Significance was accepted at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

Once all the animals were trained for 16 trials (Fig. 1), they solved the Barnes maze with great proficiency, consistently requiring less than 40 s to solve the Barnes maze after the tenth session (Fig. 1A). Likewise, the errors (Fig. 1B) and perseverances (Fig. 1C) decreased consistently, and the strategy employed was 70% sequential and 30% spatial at the end of the training (Fig. 1D).

Upon completion of this training, we evaluated the diurnal variations of the performance to solve the Barnes maze. The results showed that, during the dark phase of the cycle, at 21:00, 01:00 and 05:00 h, rats were able to shorten the time spent to solve the maze to about 11 s during the 3 days of testing (results of the third day are shown in Fig. 2A), whereas during the light phase of the cycle (09:00, 13:00 and 17:00 h), the rats needed 30 s and they included random searching to solve the maze. Saline injected at 01:00 and 13:00 h produced no changes in this pattern. In contrast, cortistatin increased significantly the time to solve the maze at these two time-points (13:00 saline:  $25 \pm 2$ ; cortistatin:  $38 \pm 6$ , 01:00 saline:  $10 \pm 1$ ; cortistatin:  $30 \pm 5$ ) (Fig. 2A). Although cortistatin increased spatial strategy expression (from 20% to 40%) while reducing sequential strategy (from 50% to 30%) at 13:00, rats increased their time to solve the Barnes maze. The delay at 01:00 h resulted from deterioration of the sequential strategy (from 60% to 20%) associated with an increase (40%) in random searching (Fig. 2B), thereby increasing the number of errors (Fig. 2C) and perseverances (Fig. 2D).



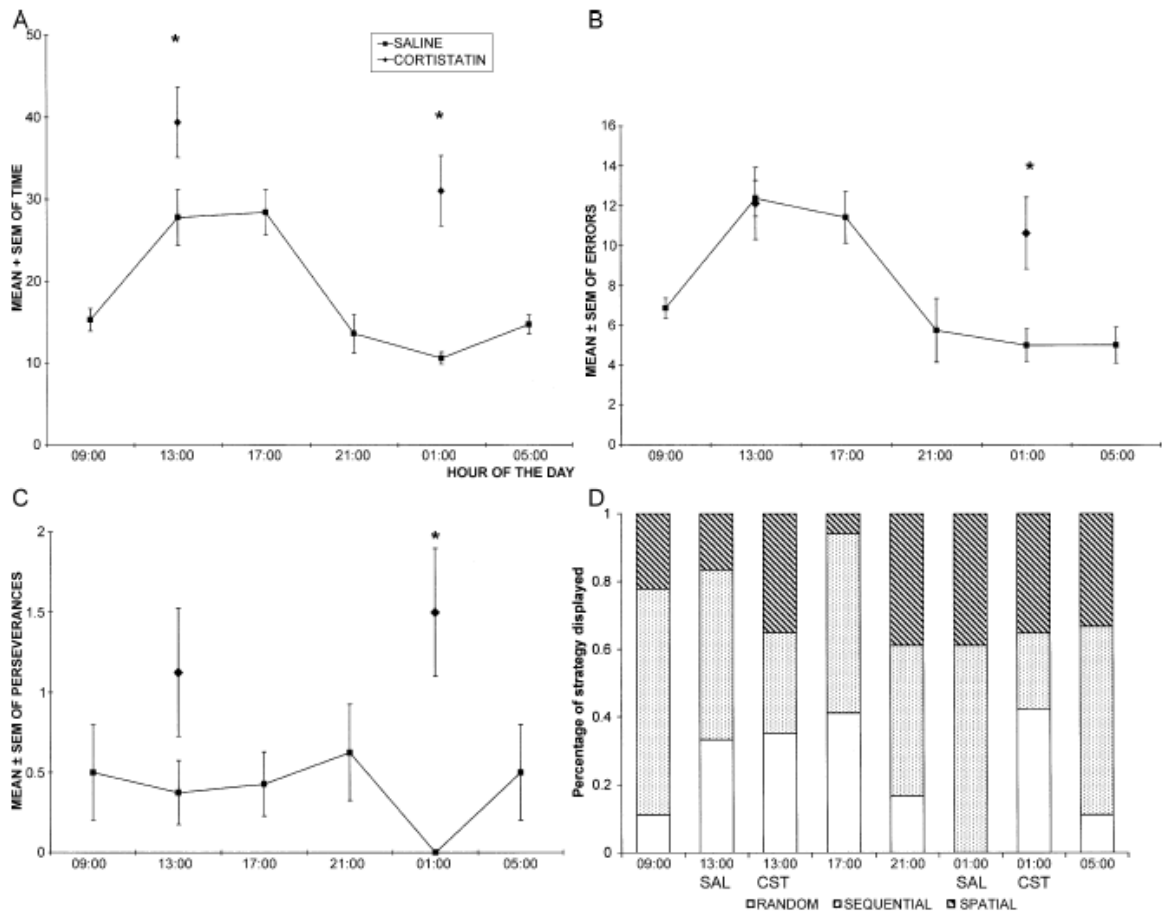


Fig. 2. Changes induced by the light-dark cycle and cortistatin on the rat's ability to solve Barnes maze. (A) Learning curve, (B) errors, (C) perseverances and (D) strategies. These results indicate that the performance of the rats is better in the dark phase of the cycle. Cortistatin impairs rat's proficiency to solve the Barnes maze at the two time-points tested, 13:00 and 01:00 h. Errors and perseverances were significantly affected at 01:00. In both situations, cortistatin impaired the sequential strategy ( $P < 0.5$ ).

cAMP concentration also fluctuated along the 24 h. Its highest concentration was detected in the hippocampus at 01:00, with another small peak at 13:00 h (Fig. 3). Cortistatin blunted the production of cAMP at both time-points (Fig. 3).

At the dark phase of the cycle, these nocturnal animals spent more time awake as compared to the light phase of the cycle, during which they spent more time in REM sleep. At 01:00 am, cortistatin decreased waking and increased REM sleep significantly, whereas at 13:00 h cortistatin reduced REM sleep with no modification in waking (Fig. 4).

Regarding motor control and equilibrium, the variation profile in the Drucker beam performance observed along the 24 h was similar to that of the Barnes maze performance. The performance was more efficient since the rats solved it in less time at 21:00, 01:00, and 05:00 h than at 13:00, 17:00, and 21:00 h (Fig. 5). Unlike saline, cortistatin

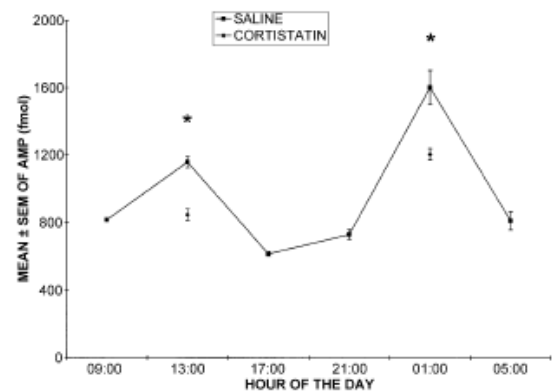


Fig. 3. cAMP concentration in the hippocampus and its changes induced by the light-dark cycle and cortistatin. Cortistatin blunted the concentration of cAMP at both time-points: 13:00 and 01:00 h ( $P < 0.5$ ).

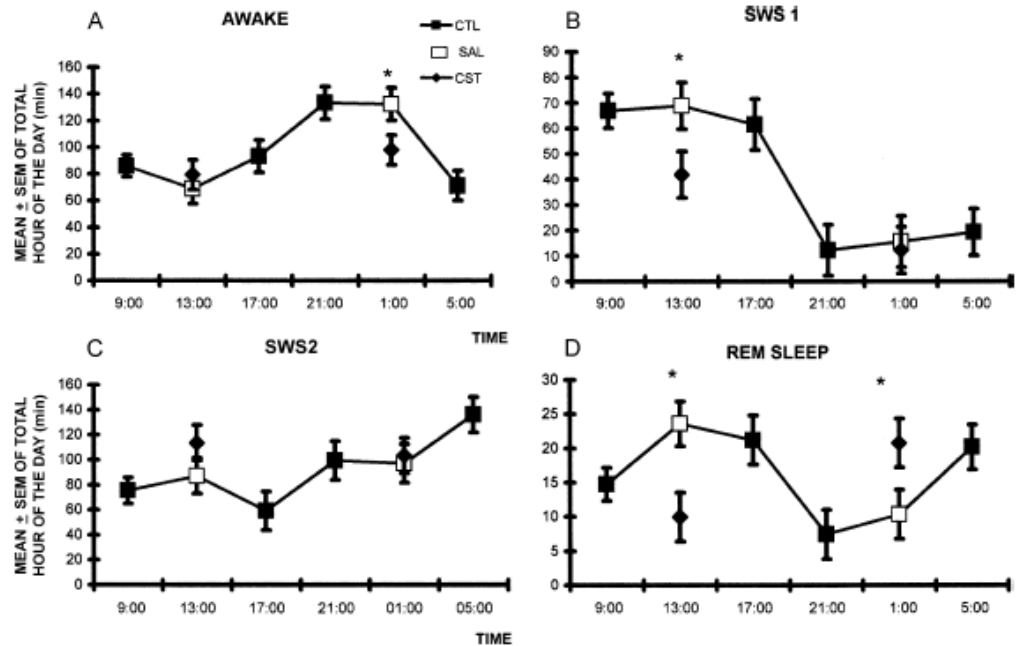


Fig. 4. Sleep–waking cycle and the effects of cortistatin at two representative time-points of the cycle (01:00 and 13:00 h). (A) Waking, (B) slow wave sleep 1, (C) slow wave sleep 2, and (D) rapid-eye-movement (REM) sleep ( $P < 0.05$ ).

deteriorated this performance at 13:00 h, but had no significant effect at 01:00 am (Fig. 5).

#### 4. Discussion

Our data reveal that rats trained to solve the Barnes maze perform with great proficiency along the light–dark cycle, yet, their performance was better during the dark phase, since the rats needed less time and selected a strategy to solve the maze. We interpret these results as indicating that the brain capacity might not be changing along the day but

the way the brain solves the problem. It has been previously suggested that evocation efficiency changes throughout the day, as assessed using several tasks (Antoniadis et al., 2000; Chaudhury and Colwell, 2002; Monk, 1994). For example, Monk suggests that the efficiency to solve memory tasks in humans follows a circadian rhythm, related to the arousal state, since the execution in the day is better than during the nighttime (Monk et al., 1997). Moreover, other indicators of cognitive functions, such as the neuroelectric component P300, have diurnal variations. Higuchi et al. (2000) have shown that the latency of the P300 is correlated positively with sleepiness and negatively with attention level in humans. Additionally, we found that although the rats solve with great proficiency the maze throughout the cycle, the strategy employed is different in both phases of the cycle. During the light cycle, the rats used 50% of sequential and 20% of spatial strategies, whereas during the dark cycle the rats used 60% of sequential and 40% spatial strategies. The rat's success in locating the escape tunnel is commonly believed to depend on the ability to make and use a spatial representation of the environment derived from the visual extramaze cues surrounding the maze. This ability is often referred as allocentric navigation or spatial strategy and is believed to depend on the hippocampus. Although the rats generally show a high tendency to use allocentric navigation to solve spatial mazes, proficient performance can be achieved using alternative strategies that are independent from the use of extramaze cues, which has been named sequential strategy and is referred to as egocentric navigation, and involves to caudate–putamen nucleus. Hence,

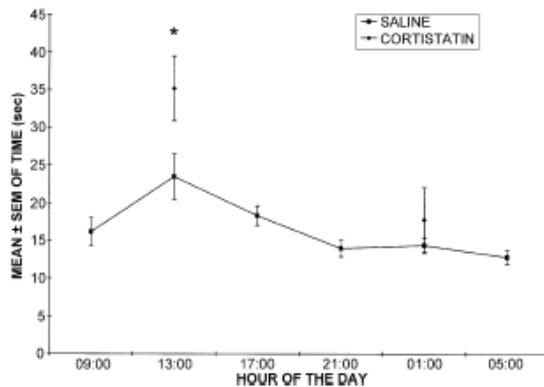


Fig. 5. The performance in the Drucker beam and the changes induced by the light–dark cycle and cortistatin at 13:00 and 01:00 h. Cortistatin deteriorated significantly the execution at 13:00 h ( $P < 0.05$ ).



both types of strategies can be used depending on the situation, for example the presence or absence of environmental light.

These results support the notion that the function of several brain structures follow a diurnal rhythm. For example, the release of hippocampal acetylcholine, an important neurotransmitter in cognitive processes, shows a circadian variation. At the start of the dark (active) period of nocturnal animals, hippocampal acetylcholine levels are increased and this increase is associated to enhanced hippocampal activity.

Additionally, we found that cortistatin modulated this proficiency at 01:00 and 13:00 h. In both situations, cortistatin impaired the sequential strategy (procedural memory), since we observed that the effect of cortistatin on the election of strategy had not diurnal variations. Random searching remained unchanged at 13:00 h, but the use of spatial strategy increased; therefore, a reduction in time to solve the Barnes maze would be expected. However, an effect on motor control should be taken into account, since cortistatin impaired motor skills at this time-point. Since spatial strategy was improved, it can be inferred that this type of memory was not affected by the motor impairment. During the dark phase, this peptide seems to interfere more directly with memory evocation, since it reduced the sequential strategy and increased random searching, thereby increasing the number of errors and perseverances. These results suggest that its effect was restricted to procedural memory, while spatial memory remained unaffected. Cortistatin effect on memory evocation has been suggested previously by other studies (Flood et al., 1997; Sánchez-Alavez et al., 2000). However, we have now shown that cortistatin rather modulates than impairs memory evocation.

Likewise, cAMP production in the hippocampus depicted diurnal variations, showing the highest peak at 01:00 h, in accordance with the best performance of the rat on the Barnes maze, whereas the lowest concentration during the light phase is consistent with the worst performance. These results are consistent with reports that suggest that activation of the cAMP pathway is important for memory evocation (Abel and Matthew Lattal, 2001; Barros et al., 2003). Cortistatin tested at 01:00 and 13:00 h blunted production of cAMP with similar efficacy at both time-points. cAMP is expected to foster the rat's proficiency in this task (Renger et al., 2000), therefore its reduction was consistent with worsening of this performance. However, the rats that received the i.c.v. administration of cortistatin and solved the Barnes maze revealed that the sequential strategy was affected but not the spatial one. Cortistatin's effect on procedural memory may be a consequence of affecting the caudate-putamen nucleus rather than the hippocampus. However, he have to prove this hypothesis by administrating cortistatin into the hippocampus as into the caudate-putamen.

The Drucker beam task reveals that the required motor-equilibrium control behavior also underwent diurnal varia-

tions, providing additional support to the observation that motivated behaviors are expressed as diurnal variations (Antoniadis et al., 2000; Monk, 1994; Monk et al., 1997). Performance in this task was also depressed by cortistatin at 13:00 h but not at 01:00 h. This effect suggests that cortistatin might interfere with motor control during the light phase, but not with motivation since rats performed more slowly than control rats but successfully. An effect on motor control may interfere with the performance of any task, such as the Barnes maze. Therefore, it is very likely that this action of cortistatin is contributing to the deterioration of the performance in the Barnes maze during the light phase. However, during the dark phase, cortistatin did not affect locomotion, yet the effect on the performance in the Barnes maze persisted, suggesting independent effects.

The results of the sleep-waking cycle reproduce previous reports. At the dark phase of the cycle (active period) of these nocturnal animals, they exhibit more time awake and less REM sleep phase as compared to the light phase. During this phase, rats solved the Barnes maze and Drucker beam tasks with the best performance. de Lecea et al. (1996) have previously reported that cortistatin regulates the sleep-waking cycle, increasing the no-REM sleep. However, we explored this effect only during the light phase. In this study, we found that, during the dark phase, cortistatin increases REM sleep and decreases waking. In contrast, during the light phase, cortistatin decreases REM sleep.

We do not know which is the action mechanism of cortistatin, however, we know that cortistatin interacts with several neurotransmission systems, such as GABA and acetylcholine in the hippocampus. We believe that cortistatin facilitates GABA action, and it has been reported that GABA induces amnesia when infused into the hippocampus (Hasselmo et al., 1996). On the other hand, cortistatin inhibits acetylcholine's action in the hippocampus (de Lecea et al., 1996). This neurotransmitter is involved in memory evocation, since cholinergic antagonists impair memory evocation (Szapiro et al., 2002). Probably, cortistatin affects cholinergic neurotransmission in the hippocampus and, in this way, modulates memory processes. However, we do not discard the possibility that cortistatin affects other modulatory systems in the brain, involved in memory processes, such as noradrenaline, serotonin, and endorphins (Abel and Matthew Lattal, 2001; Barros et al., 2001; Silva et al., 1998; Szapiro et al., 2002). Additionally, it is possible that its effect is a consequence of an interaction with other cerebral structures, such as the cerebral cortex, the nucleus striatum, through interactions with somatostatin receptors that are widely distributed along the brain or with interactions with its own recently described receptors (Robas et al., 2003).

#### Acknowledgments

This work was supported by Grant 25488N from CONACyT to OPG and by Grant G12 RR08124 from



the Research Centers at Minority Institutions program of the National Center for Research Resources, NIH to UTEP. The authors wish to thank Mr. Manuel Zarate for the care of the animals.

## References

- Abel, T., Matthew Latal, K., 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 180–187.
- Antoniadis, E.A., Ko, C.H., Ralph, M.R., McDonald, R.J., 2000. Circadian rhythms, aging and memory. *Behav. Brain Res.* 114, 221–233.
- Barnes, C.A., 1979. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol.* 93, 74–104.
- Barros, D.M., Mello e Souza, T., De David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., Ardenghi, P., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2001. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav. Brain Res.* 124, 1–7.
- Barros, D.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2003. Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Curr. Drug Targets. CNS Neurol. Disord.* 2, 81–94.
- Bennett, G.W., Ballard, T.M., Watson, C.D., Fone, K.C., 1997. Effect of neuropeptides on cognitive function. *Exp. Gerontol.* 32, 451–469.
- Chaudhury, D., Colwell, C.S., 2002. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav. Brain Res.* 133, 95–108.
- de Lecea, L., Criado, J.R., Prospéro-García, O., Gautvik, K.M., Schweitzer, P., Danielson, P.E., Dunlop, C.L.M., Siggins, G.R., Henriksen, S.J., Sutcliffe, J.G., 1996. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381, 242–245.
- de Lecea, L., del Rio, J.A., Criado, J.R., Alcantara, S., Morales, M., Danielson, P.E., Henriksen, S.J., Soriano, E., Sutcliffe, J.G., 1997. Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J. Neurosci.* 17, 5868–5880.
- Drucker-Colin, R., García-Hernández, F., 1991. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *J. Neurosci. Methods* 39, 153–161.
- Flood, J.F., Uezu, K., Morley, J.E., 1997. The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Res.* 775, 250–252.
- Hasselmo, M.E., Wyble, P.B., Wallenstein, G.V., 1996. Encoding and retrieval of episodic memories: role of cholinergic and GABAergic modulation in the hippocampus. *Hippocampus* 6, 693–708.
- Mayford, M., Kandel, E.R., 1999. Genetic approaches to memory storage. *TIG* 15, 463–470.
- Monk, T.H., 1994. Circadian Rhythms in subjective action, mood, and performance efficiency. In: Kryger, M.H., Roth, T., Dement, W.C. (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 321–330.
- Monk, T.H., Buysse, D.J., Reynolds III, C., Berga, S.L., Jarrett, D.B., Begley, H.E., Kupfer, D.J., 1997. Circadian rhythms in human performance and mood under constant conditions. *J. Sleep Res.* 6, 9–18.
- Murai, S., Saito, H., Masuda, Y., Odashima, J., Itoh, T., 1995. AF64A disrupts retrieval processes in long-term memory of mice. *NeuroReport* 26, 349–352.
- Nguyen, P., Kandel, E.R., 2000. Brief theta-burst stimulation induces a transcription-dependent late phase of LTP requiring cAMP in area CA1 of the mouse hippocampus. *Learn. Mem.* 4, 230–243.
- Renger, J.J., Ueda, A., Atwood, H.L., 2000. Role of cAMP cascade in synaptic stability and plasticity: Ultrastructural and physiological analyses of individual synaptic boutons in drosophila memory mutants. *J. Neurosci.* 20, 3980–3992.
- Riedel, G., Micheau, J., Lam, A.G., Rolof, E., Martín, S.J., Bridge, H., Hoz, L., Poeschel, B., McCulloch, J., Morris, R.G., 1999. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat. Neurosci.* 2, 898–905.
- Robas, N., Meadland, E., Fidok, M., 2003. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expresses in dorsal root ganglion. *J. Biol. Chem.* 278, 44400–44404.
- Sánchez-Alavez, M., Gómez-Chavarrín, M., Navarro, L., Jiménez-Anguiano, A., Murillo-Rodríguez, E., Prado-Alcalá, R.A., Drucker-Colin, R., Prospéro-García, O., 2000. Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res.* 858, 78–83.
- Silva, A.J., Giese, K.P., Federov, N.B., Frankland, P.W., Kogan, J.H., 1998. Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 44–61.
- Szapiro, G., Galante, J.M., Barros, D.M., Levi de Stein, M., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Izquierdo, I., Medina, J., 2002. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochem. Res.* 27, 1491–1498.
- Telegdy, G., Adamik, A., 2002. The action of orexin A on passive avoidance learning. Involvement of transmitters. *Regul. Pept.* 104, 105–110.
- Vianna, M.R.M., Szapiro, G., McGaugh, J.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2001. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12251–12254.



## Bibliografía

1. Aguilar-Roblero R, Escobar C. El sistema circádico de los mamíferos. En: Cronobiología Médica, editado por Martín del Campo Laurents A y Arechiga H, México, 2000 pp30-41.
2. Aguilar-Roblero R, Morin LP, Moore RY. Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Exp Neurol*. 1994; 130:250-260.
3. Aja S, Robinson BM, Mills KJ, Ladenheim EE, Moran TH. Fourth ventricular CART reduces food and water intake and produces a conditioned taste aversion in rats. *Behav Neurosci*. 2002; 116:918-21.
4. Akbari E, Naghdi N, Motamedi F. Functional inactivation of orexin 1 receptors in CA1 region impairs acquisition, consolidation and retrieval in Morris water maze task. *Behav Brain Res*. 2006; 173:47-52.
5. Albrecht U, Oster H. The circadian clock and behavior. *Behav Brain Res*. 2001; 125:89-91.
6. Ambroggi CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem*. 1999; 71:1-18.
7. Antoniadis EA, Ko CH, Ralph MR, McDonald RJ. Circadian rhythms, aging and memory, *Behav Brain Res* 2000; 114:221-33.



8. Aou S, Li XL, Li AJ, Oomura Y, Shiraishi T, Sasaki K, Imamura T, Wayner MJ. Orexin-A (hypocretin-1) impairs Morris water maze performance and CA1-Schaffer collateral long term potentiation in rats. *Neuroscience* 2003; 119:1221-1228.
9. Arechiga H. Los ritmos circadianos en medicina. En: *Cronobiología Médica*, editado por Martín del Campo Laurents A y Arechiga H, México, 2000 pp 9-29.
10. Aston-Jones G, Cohen JD. Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J Comp Neurol.* 2005; 493:99-110.
11. Aston-Jones GS, Desimone R, Driver J, Luck SJ, Posner MI. Attention. En *Fundamental neuroscience*. Editado por Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. Academic Press, San Diego California 1999, pp 1385-1409.
12. Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M. Impairment of spatial but no contextual memory in CaMKII mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the  $\theta$  frequency. *Cell* 1995; 81:905-15.
13. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:13445-52.
14. Barnes C.A. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979; 93:74-104.
15. Barros DM, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I. Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord.* 2003; 2:81-94.
16. Barros DM, Izquierdo LA, Mello T, Ardenghi PG, Pereyra P, Medina JH, Izquierdo I. Molecular signaling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res.* 2000; 114:183-92.



17. Bates EEM, Dieu M-C, Ravel O, Zurawsk SM, Patel S, Bridon JM, Ait-Yahia S, Vega Jr. F, Banchereau J, Lebecque. CD40L activation of dendritic cells down-regulates DORA, a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Mol Immunol.* 1998; 35:513-524.
18. Beckman, K.B. and Ames, B.N. The free radical theory of aging matures. 1998. *Physiol Rev.* 78, 547-582.
19. Bemelmans KJ, Goekoop JG, Rijk R, van Kempen GM. Recall performance, plasma cortisol and plasma norepinephrine in normal human subjects. 2003. *Biol Psychol.* 62:1-15.
20. Benstaali C, Mailloux A, Bogdan A, Auzeby A, Touitou Y. Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents. Their relations with the light-dark cycle. *Life Sci.* 2001; 68:2645-2656.
21. Bermúdez Rattoni F y Prado Alcalá RA. Estructuras subcorticales. En: Memoria. Donde reside y como se forma. Editado por F Bermúdez Rattoni y RA Prado Alcalá. Trillas, México, 2001, pp 57-69.
22. Bermúdez Rattoni F. Localización de la memoria. En: Memoria. Donde reside y como se forma. Editado por F Bermúdez Rattoni y RA Prado Alcalá. Trillas, México, 2001, pp 47-56.
23. Bermudez-Rattoni F, Mcgaugh JL. Insular cortex and amygdale lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Res.* 1991; 549:165-170.
24. Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein



kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively learning in rats. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94:7041-7046.

25. Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rew.* 2003; 42:33-84.

26. Bunce JG, Saboleck HR, Chrobak JJ: Timing of administration mediates the memory effects of intraseptal carbachol infusion. *Neurosci.* 2004; 127:593-600.

27. Burger C, López MC, Feller JA, Baker HV, Nuzyczka N, Mandel RJ. Changes in transcription within the CA1 weld of the hippocampus are associated with age-related spatial learning impairments. *Neurobiol Learn Mem.* 2006; Artículo en prensa.

28. Burgess N. The hippocampus, space, and viewpoints in episodic memory. *Q J Exp Psychol.* 2002; 55:1057-1080.

29. Cammarota M, Bevilaqua LR, Kerr D, Medina JH, Izquierdo I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallation of an extinguished conditions fear response. *J Neurosci.* 2003; 23:737-741.

30. Capasso, A. Loizz, A. Effects of cysteamine on nociception in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2002; 22:603-608.

31. Cavallaro S, Schreurs BG, Zhao W, Dágata V, Alkon D. Gene expression profiles during long-term memory consolidation. *European J Neurosci.* 2001; 13:1809-1815.

32. Collinson NJ, Atack R, Laughton P, Dawson GR, Stephens DN. An inverse agonist selective for  $\alpha 5$  subunit-containing GABAA receptors improves encoding and recall but not consolidation in the Morris water maze. *Psychopharm.* 2006; Artículo en prensa.





33. Connor M, Ingram SL, MacDonald JC. Cortistatin increase of a potassium conductance in rat locus coeruleus in vitro. *British J Pharm* 1977; 122:1567-72.
34. Criado JR, Li H, Jiang X, Spina M, Huitrón-Resédiz S, Liapakis G, Calbet M, Siehler S, Henriksen SJ, Koob, Hoyer D, Sutcliffe JG, Goodman M, de Lecea L. Structural and compositional determinants of cortistatin activity. *J Neurosci Res.* 1999; 56:611–619.
35. Cromwell HC, Hassani OK, Schultz W. Relative reward processing in primate striatum. *Exp. Brain Res.* 2005; 162:520-525.
36. Cropley V, Fujita M, Innis R, Nathan P. Molecular imaging of the dopaminergic system and its association with human cognitive function. *Biological Psychiatry.* 2006; 59: 898-907.
37. Cupples WA. Integrating the regulation of food intake. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2002; 283:R356-R357.
38. Chaudhury D, Colwell CS. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brian Res.* 2002; 133:95-108.
39. Cho YA, Giese KP, Tanila H, Silva AJ, Eichenbaum H. Abnormal hippocampal spatial representations in  $\alpha$ CaMKII t286A and CREB  $\alpha\Delta$ - mice. *Science* 1998; 279:867-9.
40. de Lecea L, Criado J R, Prospéro-García O, Gautuikk KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CLM, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 1996; 381: 242-5.



41. de Lecea L, del Rio JA, Criado JR, Alcantara S, Danielson PE, Henriksen SJ, Soriano E, Sutcliffe JG. Cortistatin is expressed in a distinct subset of cortical interneurons. *J Neurosci*. 1997; 17:5868-5880.
42. De Leonibus ED, Costantini VJA, Castellan C, Ferretti V, Oliverio A, Mele A. Distinct roles of the different different ionotropic glutamate receptors within the nucleus accumbens in passive avoidance learning and memory in mice. *Eur J Neurosci*. 2003; 18:2365-2373.
43. de Oliveira AL, de Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VB, Quillfeldt JA. Amnesic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2005; 83:119-124.
44. de Oliveira AL, Genro BP, Breda RV, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res*. 2006; 1075:60-67.
45. Deacon RM, Rawlins JN. Learning impairments of hippocampal-lesioned mice in a paddling pool. *Behav Neurosci*. 2002; 116:472-478.
46. DeCoteau WE, Kesner RP. A double dissociation between the rat hippocampus and medial caudoputamen in processing two forms of knowledge. *Behav Neurosci*. 2000; 114:1096-1108.
47. Dent, G.W., O'Dell, D.M., Eberwine, J.H., 2001. Gene expression profiling in the amygdala: An approach to examine the molecular substrates of mammalian behavior. *Physiol Behav*. 73, 841-847.



48. Deurveilher S, Semba K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioral state. *Neuroscience*. 2005; 130:165-83.
49. Díaz-Muñoz M, Dent MA, Granados-Fuentes D, Hall AC, Hernandez CA, Harrington ME, Aguilar-Roblero R. Circadian modulation of the ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents. *Neuroreport*. 1999; 10:481-6.
50. Dick P, Katsuyuki S. The prefrontal cortex and working memory: physiology and brain imaging. *Curr Opin Neurobiol*. 2004; 14:163-168.
51. Dijk DJ, von Schantz M. Timing and consolidation of human sleep, wakefulness, and performance by a symphony of oscillators. *J Biol Rhythms*. 2005; 20:279-90.
52. Drucker-Colín R, García-Hernández F. A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *J Neurosci Methods* 1991; 39:153-61.
53. Dutar P, Vaillend C, Viollet C, Billard JM, Potier B, Carlo AS, Ungerer A, Epelbaum J. Spatial learning and synaptic hippocampal plasticity in type 2 somatostatin receptor knock-out mice. *Neuroscience* 2002; 112:455-466.
54. Farr SA, Flood JF, Morley JE. The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus. *Neurobiol Learning Mem*. 2000; 73:150-167.
55. Fernández Ruiz J y Bermúdez Rattoni F. Clasificación de la memoria. En: *Memoria. Donde reside y como se forma*. Editado por F Bermúdez Rattoni y RA Prado Alcalá. Trillas, México, 2001, pp 11-25.
56. Flood JF, Uezu K, Morley JE. The cortical neuropeptide, cortistatin-14, impairs post-training memory processing. *Brain Res*. 1997; 775: 250-252.



57. Folkard S, Monk T, Time of day and processing a strategy in free recall. *Q J Exp Psychol.* 1979; 31:461-475.
58. Frielingsdorf H, Thal LJ, Pizzo DP. The septohippocampal cholinergic system and spatial working memory in the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2006; 168(1):37-46
59. Gall CM, Hess US, Lynch G. Mapping brain networks engaged by, and changed by, learning. *Neurobiol Learn Mem.* 1998; 70:14-36.
60. Gallo M, Rolda G, Burges J. Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdale in the acquisition and retrieval of conditions taste aversion in rats. *Behav Brain Res.* 1992; 52:91-97.
61. Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A. Loss of muscarinic antinociception by antisense inhibition of M1 receptors, *Br J Pharmacol.* 2000; 129:1633-1640.
62. Giovannini MG, Pazzagli M, Malmberg-Aiello P, Della Corte L, Rakovska AD, Cerbai F, Casamonte F, Pepeu G. Inhibition of acetylcholine-induced activation of extracellular regulated protein kinase prevents the encoding of an inhibitory avoidance response in the rat. *Neurosci.* 2005; 136:15-32.
63. Gold PE. Acetylcholine modulation of neural systems in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2003; 80:194-210.
64. Goldman-Rakic SP. Memory: recording experience in cells and circuits: diversity in memory research. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:13435-7.
65. Gordon GRJ, Bains JS. Can homeostatic circuits learn and remember? *J. Physiol.* 2006; article in press.
66. Guarna M, Ghelardini C, Galeotti N, Stefano GB, Bianchi E. Neurotransmitter role of endogenous morphine in CNS. *Med Sci Monit,* 2005; 11: RA190-193.



67. Guillou JL, Micheau J, Jaffard R. Intrahippocampal injections of cysteamine improves the retention of bar-pressing task in mice. *Behav Brain Res.* 1999; 103:113-117.
68. Guillou JL, Micheau J, Jaffard R. The opposite effects of cysteamine on the acquisition of two different tasks in mice are associated with bidirectional testing-induced changes in the hippocampal adenylylase activity. *Behav Neurosci.* 1998; 112:900-908.
69. Hammamieh R, Yang DCH. Magnesium ion-mediated binding to tRNA by an amino-terminal peptide of a class II tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 2001; 276, 428-433.
70. Hartvig P, Gillberg PG, Gordh T Jr, Post C. Cholinergic mechanisms in pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci. Suppl.* 1989; 75-79.
71. Hashimoto K, Miyata M, Watanabe M, Kano M. Roles of phospholipase C beta4 in synapse elimination and plasticity in developing and mature cerebellum. *Mol Neurobiol.* 2001; 23:69-82.
72. Hasselmo ME. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological bases of behavior. *Behav Brain Res.* 1995; 67:1-27.
73. Higuchi S, Liu Y, Maeda A, Motohashi Y. Diurnal variation in the P300 component of human cognitive event-related potential. *Chronobiol Int.* 2000; 17:669-678.
74. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002; 337:131-134.
75. Hiramatsu M, Inoue K. Des-tyrosine<sup>1</sup> dynorphin A<sub>2-13</sub> improves carbon monoxide-induced impairment of learning and memory in mice. *Brain Res.* 2000; 859:303-310.



76. Hiramatsu M, Watanabe E. Dynorphin A (2-13) improves mecamylamine-induced learning impairment accompanied by reversal of reductions in acetylcholine release in rats. *Neuropeptides*, 2006; 40:47-56.
77. Holloway F, Wansley R. Multiphasic retention deficits at period intervals after passive-avoidance learning. *Science* 1973; 180:208-10.
78. Hsieh MT, Hsieh CL, Lin LW, Wu CR, Huang GS. Differential gene expression of scopolamine-treated rat hippocampus-application of cDNA microarray technology. *Life Sci*. 2003; 73:1007-1016.
79. Inturrisi CE. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain* 2002; 18:S3-S13.
80. Irwin LN. Gene expression in the hippocampus of behaviorally stimulated rats: analysis by DNA microarray. *Mol Brain Res*. 2001; 96:163-169.
81. Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi PG, Rodriguez C, Choi H, Medina JH, Izquierdo I. Different hippocampal molecular requirements for short and long term retrieval of one-trial avoidance learning. *Behav Brain Res* 2000; 111:93-8.
82. Jaeger LB, Farr SA, Banks WA, Morley JE. Effects of orexin-A on memory processing. *Peptides* 2002; 23:1683-1688.
83. Janz R, Sudhof T, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov V. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron* 1999; 24:687-700.
84. Jay TM. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2003; 69:375-390.



85. Jazberenyi M, Bujdoso E, Kiss E, Pataki I, Telegdy G. The role of NPY in the mediation of orexin-induced hypothermia, *Regul Pep.* 2002; 104:55-59.
86. Justino L, Welner SA, Tannenbaum GS, Schipper HM. Long-term effects of cysteamine on cognitive and locomotor behavior in rats: relationship to hippocampal glial pathology and somatostatin levels. *Brain Res.* 1997; 761:127-34.
87. Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. Learning and memory. En: *Principles of neural sciences.* Editado por Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 4ª edición, 2000, pp 1227-46.
88. Kandel ER. Cellular mechanisms of learning and biological basis of individuality. En: *Principles of neural sciences.* Editado por Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. E, 4ª edition, 2000 pp1247-79.
89. Kappel M, Poulsen TD, Hansen MB, Galbo H, Pederson BK. Somatostatin attenuates the hyperthermia induced increase in neutrophil concentration, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998; 77:149-156.
90. Kimura KA, Brien JF. Hippocampal nitric oxide synthase in the fetal guinea pig: effects of chronic prenatal ethanol exposure. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998; 106:39-46.
91. King DL, Arendash GW. Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. *Brain Res.* 2002; 926:58-68.
92. Konecka AM, Sroczynska I. Circadian rhythm of pain in male mice. *Gen Pharmacol.* 1998; 31:809-810.



93. La force Jr. R, Doyon J. Distinct contribution of the striatum and cerebellum to motor learning. *Brain and Cognition*. 2001; 189-211.
94. LaLumiere RT, Buen TV, McGaugh JL. Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. *J Neurosci*. 2003; 23:6754-6758.
95. Lamirault L, Guillou JL, Micheau J, Jaffard R. Intrahippocampal injections of somatostatin dissociates acquisition from the flexible use of place responses. *Eur J Neurosci*. 2001; 14:567-570.
96. Lapiz MDS, Morilak DA. Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by intentional set shifting capability. *Neurosci*. 2006; 137:1039–1049.
97. Lee D, O'Dowd D. CAMP dependent plasticity at excitatory cholinergic synapses in *Drosophila* neurons: alterations in the memory mutant *dunce*. *J Neurosci*. 2000; 20:2104-11.
98. Lerer B, Altman H, Stanley M. Enhanced of memory by cholinesterase inhibitor associated with muscarinic receptor down-regulation. *Pharmacol Biochem Behav*. 1984; 21:467-469.
99. Letwin NE, Kafkaf Ni, Benjamini Y, Mayo C, Frank BC, Luu T, Lee NH, Elmer GI. Combined application of behavior genetics and microarray analysis to identify regional expression themes and gene–behavior associations. *J Neurosci*. 2006; 26:5277–5287.
100. Levy R, Goldman-Rakic P. Segregation of working memory within the dorsal prefrontal cortex. *Exp. Brain Res*. 2000; 133: 23-32.





101. Liao RM, Lai WS, Lin JY. The role of catecholamines in retention performance of partially baited radial eight-arm maze for rats. *Chin J Physiol.* 2002; 45:177-185.
102. Liu Q, Cescato R, Dewi DA, Rivier J, Reubi J-C, Schombrunn A. Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs. *Mol Pharmacol.* 2005; 68:90-101.
103. Luo Y, Long JM, Spangler EL, Longo DL, Ingram DK, Weng NP. Identification of maze learning-associated genes in rat hippocampus by cDNA microarray. *J Mol Neurosci.* 2001; 17:397-404.
104. Maheu FS, Collicutt P, Kornik R, Moszkowski R, Lupien SJ. The perfect time to be stressed: a differential modulation of human memory by stress applied in the morning or in the afternoon. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005; 29:1281-8.
105. Mansuy I. A constraint on cAMP signaling. *Neuron* 2004; 41:4-6.
106. Martel G, Millard A, Jaffard R, Guillou JL. Stimulation of hippocampal adenylyl cyclase activity dissociates memory consolidation processes for response and place learning. *Learn Mem.* 2006; 13:342-348.
107. Matsuda K, Mizuguchi K, Nishioka T, Kato H, Go N, Oda J. Crystal structure of glutathione synthetase at optimal pH: domain architecture and structural similarity with other proteins. *Protein Eng.* 1996; 9:1083-92.
108. Maubach K. GABA(A) receptor subtype selective cognition enhancers. *Curr Drug Target CNS Neurol Disord.* 2003; 2:233-239.
109. May LG, Johnson S, Krebs S, Newman A, Aronstam R. Involvement of protein kinase C and protein kinase A in the muscarinic receptor signaling pathways mediating



phospholipase C activation, arachidonic acid release and calcium mobilization. *Cell Signal*. 1999; 3:179-187.

110. Mayford M, Kandel ER. Genetic approaches to memory storage. *TIG*. 1999; 15:463-70.

111. McKenna JE, Melzack R. Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus, *Pain* 1992; 49:105-112.

112. McKenna JE, Melzack R. Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test, *Exp Neurol*. 2001; 172:92-99.

113. Mei B, Li C, Dong S, Jiang CH, Wang H, Hu Y. Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Res Bull*. 2005; 67:1-12.

114. Méndez-Díaz M, Guevara-Martínez M, Alquicira CR, Guzmán Vásquez K, Prospéro-García O. Cortistatin, a modulatory peptide of sleep and memory, induces analgesia in rats. *Neurosci Lett*. 2004; 354:242-244.

115. Méndez-Díaz M, Irwin L, Gómez-Chavarín, M., Jiménez-Anguiano, A, Cabeza R., Murillo Rodríguez, E. and Prospéro-García O. Cortistatin modulates memory evocation in rats. *E J Phar*. 2005; 507:21-28.

116. Meneses A. Could the 5HT<sub>1B</sub> receptor inverse agonism affects learning consolidation? *Neurosci and Behav Rev*. 2001; 25:193-201.

117. Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20:445-468.



118. Milner B. Aspects of human frontal lobe function. En: *Epilepsy and the functional anatomy of the frontal lobe*. Editado por Jasper HH, Riggio S, y Goldman-Rakic PS. Raven Press, New York 1995, pp 67-84.
119. Mizuno T, Arita J, Kimura F. Spontaneous acetylcholine release in the hippocampus exhibits a diurnal variation in both young and old rats. *Neurosci Lett*. 1994; 178:271-274.
120. Monda M, Viggiano A, De Luca V. Paradoxical effect of orexin A: hypophagia induced by hyperthermia. *Brain Res*. 2003; 961:220-228.
121. Monk TH, Buysse DJ, Reynolds CF3rd, Berga SL, Jarrett DB, Begley HE, Kupfer DJ. Circadian rhythms in human performance and mood under constant conditions. *J Sleep Res*. 1997; 6:9-18.
122. Monk TH. Circadian Rhythms in subjective action, mood, and performance efficiency. En: *Principles and practice of Sleep Medicine*. Editado por Kryger, Roth y Dement. 2ª Ed, 1994, pp 321-30.
123. Murillo-Rodríguez E, Cabeza R, Méndez-Díaz, M, Navarro L, Prospéro-García, O. Anandamide-induced sleep is blocked by SR141716A, a CB1 receptor antagonist and U73122, a phospholipase C inhibitor. *Neuroreport*; 2001;12:2131-6.
124. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev*. 2003; 41:268-87.
125. Neill JC, Sarkisian MR, Wang Y, Liu Z, Yu L, Tandon P, Zhang G, Holmes GL, Geller AI. Enhanced auditory reversal learning by genetic activation of protein kinase C in small groups of rat hippocampal neurons. *Mol Brain Res*. 2001; 93:127-136.



126. Nguyen P, Kandel ER. Brief theta-burst stimulation induces a transcription-dependent late phase of LTP requiring cAMP in area CA1 of the mouse hippocampus. *Learn Mem* 2000; 4:230-43.
127. Nihei MK, McGlothan JL, Toscano CD, Guilarte TR. Low level Pb<sup>2+</sup> exposure affects hippocampal protein expression in rats. *Neurosci Lett*. 2001; 298:212-216.
128. O'Donnell J, Stemmelin J, Nitta A, Brouillette J, Quirion R. Gene expression profiling following chronic NMDA receptor blockade-induced learning deficits in rats. *Synapse* 2003; 50:171-180.
129. Orsetti M, Dellarole A, Ferri S, Ghi P. Acquisition, retention, and recall of memory after injection of RS67333, a 5-HT(4) receptor agonist, into the nucleus basalis magnocellularis of the rat. *Learn Mem*. 2003;10:420-426.
130. Owen AM. The role of the lateral frontal cortex in mnemonic processing: the contribution of functional neuroimaging. *Exp Brain Res*. 2000; 133:33-43.
131. Oxenkrug G, Requintina P, Bachurin S. Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin and melatonin in the in vivo models. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 939:190-199.
132. Pape HC, Stork O. Genes and mechanisms in the amygdale involved formation of fear memory. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 985:92-105.
133. Pare D. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog Neurobiol*. 2003; 70:409-420.
134. Paxinos G, Watson Ch. *The rat Brain in stereotaxic coordinates*. Second edition. Academic Press Inc. 1986, 119 págs.



135. Pepeu G, Giovannini MG. Changes in Acetylcholine Extracellular levels during cognitive processes. *Learn Mem.* 2004 11: 21-27.
136. Perez-Ruiz C, Prado-Alcalá RA. Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: protective effect of the negative reinforcers. *Brain Res Bull.* 1989; 22:599-603.
137. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodríguez de Fonseca F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21: 218-224.
138. Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem.* 2003; 80:178-193.
139. Prado-Alcalá RA, Fernández-Samblancat M, Solodkin-Herrera M. Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and maintenance of passive avoidance. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 22:243-247.
140. Prado-Alcalá RA, Haiek M, Rivas S, Roldán-Roldán G, Quirarte GL. Reversal of extinction by scopolamine. *Physiol Behav.* 1994; 56:27-30.
141. Prospéro-García O, Méndez-Díaz M. The role of neuropeptides in sleep modulation. 2004; *Drug News Perspect.* 17:518-522.
142. Radecki DT, Brown ML, Martinez J, Teyler TJ. BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP. *Hippocampus.* 2005; 15:246-53.
143. Ramanathan L, Gulyani S, Nienhuis R, Siegel JM: Sleep deprivation decreases superoxide dismutase activity in rats hippocampus and brainstem. *Neuroreport* 2002; 13:1387-1390.



144. Reisine T, Bell G. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocrine Rev.* 1995; 16:427-442.
145. Reneman L, Schilt T, de Win MM, Booij J, Schmand B, van den Brink W, Bakker O. Memory function and serotonin transporter promoter gene polymorphism in ecstasy (MDMA) users *J Psychopharmacol.* 2006; 20:389–399.
146. Renger JJ, Ueda A, Atwood HL. Role of cAMP cascade in synaptic stability and plasticity: ultra structural and physiological analyses of individual synaptic buttons in drosophila memory mutants. *J Neurosci.* 2000; 20:3980-92.
147. Rivas-Arancibia S, Dorado-Martínez C, Borgonio-Perez G, Hiriart-Urdanivia M, Verdugo-Díaz L, Duran-Vázquez A, Colín-Baranque L, Ávila-Costa MR. Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ Res.* 2000; 82:7-17.
148. Robas N, Meadland E, Fidok M. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expresses in dorsal root ganglion. *J Biol Chem.* 2003; 278:44400-44404.
149. Roesler R, Vianna MRM, Schröder N, Cardoso MB, Quevedo FJ. Aversive learning under different training conditions: Effects of NMDA receptor blockade in area CA1 of the hippocampus. *Neurochem Res.* 2006; 31:679–683.
150. Roldan G, Bolaños-Badillo E, González-Sánchez H, Quitarte G, Prado-Alcalá RA. Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neurosci Lett.* 1997; 230:93-96.
151. Roldan G, Cobos-Zapiain G, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Dose- and time-dependent scopolamine induced recovery of an inhibitory avoidance response after its extinction in rats. *Behav Brain Res.* 2001; 121:173-179.



152. Rolls ET. Memory systems in the brain. *Ann Rev Psychol.* 2000; 51:599-630.
153. Rönnbäck A, Dahlqvist P, Bergstrom SA, Olsson T. Diurnal effects of enriched environment on immediate early gene expression in the rat brain. *Brahón Res.* 2005; 1046:137-44.
154. Ross RS, Eichenbaum H. Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *J Neurosci.* 2006; 26(18):4852– 4859.
155. Rueda-Orozco PE, Galicia O, Soria-Gómez E; Herrera-Solís A, Prospéro-García O. Diurnal variations in the effect induced by anandamide, oleamide and their combination on the generation of the event-related potentials (ERPs) in rats. Artículo en preparación.
156. Rueda-Orozco PE, Soria-Gómez E, Martínez-Vargas M, Galicia O, Navarro L, Prospéro-García O. A potencial function of endocannabinoids on the brain selection for a navigation strategy. Artículo en preparación.
157. Saint-Cyr JA, Taylor AE, Lang AE. Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. *Brain* 1998; 111:941-959.
158. Salado-Castillo R, Díaz del Guante M, Alvarado R, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Effects of regional GABAergic blockade striatum on memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 1996; 66:102-8.
159. Salinska E, Stafiel A. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are involved in early phase of memory formation: possible role of modulation of glutamate release. *Neurochem Int.* 2003; 43:469-474.



160. Sánchez-Alavez M, Gómez-Chavarín M, Navarro L, Jiménez-Anguiano A, Murillo-Rodríguez E, Prado-Alcalá RA, Drucker-Colín R, Prospéro-García, O. Cortistatin modulates memory processes in rats. *Brain Res.* 2000; 858:78-83.
161. Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, Giulivi C. The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001; 276:6945-9.
162. Savage LM, Buzzetti RA, Ramirez DR. The effects of hippocampal lesions on learning, memory, and reward expectancies. *Neurobiol Learn Mem.* 2004; 82:109-119.
163. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neuropsychiatry Cli. Neurosci.* 2000; 12:103-113.
164. Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE. Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem.* 1999; 6:97-110.
165. Schmitt, JAJ, Wingen M, Ramaekers JG, Evers EAT, Riedel WJ. Serotonin and human cognitive performance. *Current Pharmaceutical Design.* 2006; 12:2473-2486.
166. Schroder N, O'Dell SJ, Marshall JF. Neurotoxic metamphetamine regimen impairs recognition in rats. *Synapse* 2003; 49:89-96.
167. Sei H, Sano A, Oishi K, Fujihara H, Kobayashi H, Ishida N, Morita Y. Increase of hippocampal acetylcholine release at the onset of dark phase is suppressed in a mutant mice model of evening-type individuals. *Neuroscience* 2003; 11:785-789.
168. Sen AP, Bhattacharya SK. Thermic response of selective muscarinic agonists and antagonists in rats. *Indian J Exp Biol.* 1991; 29:131-135.





169. Shinoe T, Mtsui M, Taketo MM, Manabe T. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 2005; 25(48):11194-11200.
170. Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. 125(Tyr10)-Cortistatin-14 labels all five somatostatin receptors. *Arch Pharmacol.* 1998; 357:483-489.
171. Silva AJ<sub>a</sub>, Giese KP, Federov NB, Frankland PW, Kogan JH, Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Mem.* 1998; 70:44-61.
172. Silva AJ<sub>b</sub>, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Ann Rev Neurosci.* 1998; 21:127-48.
173. Simonic A, Roganovic-Dordevi J, Golubovic V. Influence of various cholinergic and anticholinergic drugs on rectal temperature in rats, *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1988; 294:273-282.
174. Spier AD, de Lecea L. Cortistatin: a member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res Rev.* 2000; 33:228–241.
175. Spier AD, Fabre V, de Lecea L. Cortistatin radioligand binding in wild-type and somatostatin receptor-deficit mouse brain. *Reg. Peptides.* 2005; 124:179-186.
176. Sprague JE, Preston AS, Leifheit M, Woodside B. Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning. *Physiol Behav.* 2003; 79:281-287.
177. Squire LR, Stark CEL, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci.* 2004; 27:279-306.



178. Squire LR. *Definitions: Memory and Brain*. Oxford University Press. New York 1987. 315 pág.
179. Sun CY, Qi SS, Lou XF, Sun SH, Wang X, Dai KY, Hu SW, Liu NB. Changes of learning, memory and levels of CaMKII, CaM mRNA, CREB mRNA in the hippocampus of chronic multiple-stressed rats. *Chin Med J (Engl)*. 2006; 19(2):140-147.
180. Szekely M, Petervari E, Balasko M, Hernadi I, Uzsoki B. Effects of orexins on energy balance and thermoregulation, *Regul Pep*. 2002; 104:47-53.
181. Takahashi A, Kishi E, Ishimaru H, Ikarashi Y, Murayama Y. Role of preoptic and anterior hypothalamic cholinergic input on water intake and body temperature. *Brain Res*. 2001; 889:191-199.
182. Takeo S, Niimura m, Miyake-Takagi K, Fukatsu T, Tkagi N, Tanonaka K, Hara J. A possible mechanism for improvement by a cognition-enhancer nefiracetam of spatial memory function and cAMP-mediated signal transduction system in sustained cerebral ischemia in rats. *Br J Pharmacol*. 2003; 138:642-654.
183. Tallent MK, Fabre V, Qiu C, Calbet M, Lamp T, Barattan M, Suzuki Ch, Levy CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Criado JR, Roberts A, de Lecea L. Cortistatin over expression in transgenic mice produce deficits in synaptic plasticity and learning. *Mol Cell Neurosci*. 2005; 30:465-475.
184. Thompson RF, Kim JJ. Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93:13438-44.
185. Tischmeyer W, Grimm R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Moll Life Sci*. 1999; 55:564-74.



186. Tokita K, Inoue T, Yamazaki S, Wang F, Yamaji T, Matsuoka N, Mutoh S. FK962, a novel enhancer of somatostatin release, exerts cognitive-enhancing actions in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005; 527:111–120.
187. Tsai YC, So EC, Chen HH, Wang LK, Chien CH. Effect on intratecal octreotide on thermal hyperalgesia and evoked spinal c-Fos expression in rats with sciatic constriction injury. *Pain* 2001; 99:407-413.
188. Turner, KM, Burgoyne RD, Morgan A. Protein phosphorylation and regulation of synaptic membrane traffic. *TINS.* 1999; 22:459-464.
189. Varvel SA, Cravatt BF, Engram AE, Lichtman AH. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) mice exhibit an increased sensitivity to the disruptive effects of anandamide or oleamide in a working memory water maze task. *JPET.* 2006; 317:251–257.
190. Vermetten E, Vythilingam M, Southwick SM, Charney DS, Bremner JD. Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 2003; 54:693-702.
191. Vogel C, Mossner R, Gerlach M, Heinemann T, Murphy DL, Riederer P, Lesch KP, Sommer C. Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. *J Neurosci.* 2003; 15; 23(2):708-15.
192. Wagatsuma A, Azami S, Sakura M, Hatakeyama D, Aonuma H, Ito E. De Novo synthesis of CREB in a presynaptic neuron is required for synaptic enhancement involved in memory consolidation. *J Neurosci Res.* 2006; 84:1610-1620.
193. Waltereit. Signaling from cAMP/PKA to MAP and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* 2003; 27:99-106.



194. Wallenstein GV, Vago DR, Walberer AM. Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. *Behav Brain Res.* 2002; 133:159-164.
195. White NW. Mnemonic functions of the basal ganglia. *Curr. Opin Neurobiol.* 1997; 7:164-169.
196. Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:429-458.
197. Wolff MC, Leander JD. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. *Eur J Pharmacol.* 2003; 477:213-217.
198. Wotjak CT. Role of Endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Med Chem.* 2005; 5:659-670.
199. Wotjak CT. Role of Endogenous cannabinoids in cognition and emotionality *Mini-Revs Med Chem.* 2005; 5:659-670.
200. Wu M, Zhang Z, Leranath C, Xu C, van den Pol AN, Alreja M. Hypocretin increases impulse flow in the septohippocampal GABAergic pathway: implications for arousal via mechanism of hippocampal disinhibition. *J Neurosci.* 2002; 23:1683-1688.
201. Zarrindast MR, Mahmoudi M. GABA mechanisms and antinociception in mice with ligated sciatic nerve. *Pharmacol Toxicol.* 2001; 89:79-84.
202. Zhao H, Xu H, Xu X. Effects of naloxone on the long-term potentiation of EPSPs from the pathway of Schaffer collateral to CA1 region of hippocampus in aged rats with declined memory. *Brain Res.* 2004; 996:111– 116.