



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROQUÍMICA  
DEL HIPOCAMPO DURANTE LA EVOCACIÓN DE LA  
MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A

VALERIA VIOLANTE SORIA

DIRECTORA DE TESIS  
Q.F.B. Perla del Rocío Moreno Castilla

Revisor: Dr. César Casasola Castro



Facultad  
de Psicología

Ciudad Universitaria

Junio, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



*A quienes han construido mis más valiosos recuerdos  
-a mi familia y amigos-.*



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del aprendizaje y la memoria, de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 155242, así como del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN209413.



## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por integrarme a su equipo de trabajo, así como por designarme Ayudante de Investigador del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) nivel III en el periodo de junio 2011 a junio 2012.

Mi gratitud hacia mi directora de tesis Perla Moreno por su asesoría académica y amistosa; a mi revisor de tesis, Dr. Cesar Casasola, por su tiempo brindado en el mejoramiento en la calidad del presente trabajo; y a las técnicas académicas, la Dra. Israela Balderas y a la Dra. Leticia Ramírez, por su apoyo durante la realización de éste proyecto.

A los miembros del jurado, la Dra. Martha Escobar, el Dr. David Velázquez y el Dr. Antonio Zainos por su valiosa revisión y por sus acertadas correcciones, muchas gracias.

Al Dr. Fernando García, por las facilidades técnicas brindadas en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Y un especial reconocimiento a mis compañeros Daniel Ávila y Alejandro Bárcenas por su valiosa participación en el desarrollo de mi tesis; así como a los compañeros de laboratorio por los consejos y agradables momentos.



## Abreviaturas

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>CA1</b>	Cuerno de Ámon 1
<b>CA3</b>	Cuerno de Ámon 3
<b>CI</b>	Corteza insular
<b>DA</b>	Dopamina
<b>ER</b>	Corteza entorrinal
<b>FCEA</b>	Fluido cerebroespinal artificial
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GLU</b>	Glutamato
<b>HIP</b>	Hipocampo
<b>IE</b>	Índice de exploración
<b>IRC</b>	Índice de reconocimiento del contexto
<b>IRU</b>	Índice de reconocimiento de la ubicación
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>PER</b>	Corteza perirrinal
<b>POR</b>	Corteza postrrinal
<b>TTE</b>	Tiempo total de exploración

# Índice general

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>11</b>
2.1	Disociación funcional en el lóbulo temporal . . . . .	11
2.1.1	Actividad del hipocampo en la memoria de reconocimiento	12
2.1.2	Neurotransmisión de la memoria de reconocimiento . . . . .	15
<b>3</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>23</b>
3.1	Objetivo general . . . . .	24
3.2	Hipótesis . . . . .	24
3.3	Diseño experimental . . . . .	25
<b>4</b>	<b>Metodología experimental</b>	<b>27</b>
4.1	Sujetos . . . . .	27
4.2	Estandarización de tareas de reconocimiento espontáneo de objetos	28
4.3	Análisis conductual . . . . .	31
4.4	Análisis neuroquímico . . . . .	33
4.4.1	Microdiálisis en libre movimiento . . . . .	33
4.4.2	Detección de los neurotransmisores . . . . .	36
4.5	Análisis estadístico . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	<b>41</b>
5.1	Evaluación y estandarización de protocolos conductuales . . . . .	41
5.2	Evaluación de la <i>memoria de ubicación de objetos</i> pareada con el muestreo de neurotransmisores . . . . .	44
5.3	Análisis de los neurotransmisores durante la fase de evocación . . . . .	48
<b>6</b>	<b>Discusión</b>	<b>53</b>
6.1	Participación funcional de los neurotransmisores en la memoria de reconocimiento . . . . .	55

6.2	Disociación neuroquímica del componente contextual . . . . .	59
6.3	Implicaciones de la evocación conductual . . . . .	60
6.4	Trabajos futuros . . . . .	60
<b>7</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>63</b>
	<b>Referencias</b>	<b>65</b>
	<b>Apéndice</b>	<b>70</b>

## Resumen

Las evidencias en modelos animales indican que el sistema centrado en las cortezas perirrinal e insular es importante para discriminar la familiaridad de estímulos individuales, mientras que el sistema centrado en el hipocampo es importante para reconocer la distribución espacial de los estímulos. A esta propuesta se ha denominado *disociación de la memoria de reconocimiento*. La disociación de información comprometida con el hipocampo se ha extendido a los procesos de consolidación y evocación; más aún, las evidencias que ponen a prueba la actividad de los neurotransmisores sugieren que la transmisión dopaminérgica, noradrenérgica y glutamatérgica incrementa durante las fases de evocación de la memoria, o bien durante el procesamiento de información contextual.

El presente trabajo investiga la liberación de los neurotransmisores dopamina, norepinefrina, glutamato y GABA en el hipocampo y en la corteza insular, mediante la técnica de microdiálisis en libre movimiento recuperamos muestras de fluido cerebroespinal antes, durante y después de que ratones ejecutaran la fase de evocación de la tarea *memoria de ubicación de objetos*.

Encontramos que la dopamina y norepinefrina en el hipocampo incrementaron su liberación cerca de un 300% y 200%, respectivamente, mientras que en la corteza insular no se registraron cambios en ninguno de los neurotransmisores. Dicho incremento en la liberación de dopamina y norepinefrina se asoció con un reconocimiento exitoso del componente contextual.

Los resultados obtenidos apoyan la disociación del componente contextual de la memoria de reconocimiento y nos permiten hipotetizar que algunas funciones dependientes de hipocampo pueden estar mediadas por los neurotransmisores dopamina y norepinefrina.



# 1 Introducción

## Conceptos del aprendizaje y la memoria

Los procesos de aprendizaje y memoria se pueden observar en dos niveles, cambios en la plasticidad de la sinapsis y modificaciones en la cognición y conducta (Dudai, 1989).

El *aprendizaje* se define como la adquisición de nueva información codificada en representaciones internas de circuitos neuronales distribuidos en amplias áreas del cerebro (Moscovitch, 2007). La *memoria* se define por los procesos que comprende -almacenamiento, consolidación y evocación-. El *almacenamiento* tiene como fin retener en el tiempo las representaciones creadas o modificadas por el aprendizaje. La *consolidación* permite la perdurabilidad de la información, formando así memorias a largo plazo<sup>1</sup>. La *evocación* es la capacidad para reactivar o acceder a las representaciones de la información y permite que la memoria se manifieste conductualmente (Dudai, Roediger y Tulving, 2007).

Desde una perspectiva neurobiológica, se considera que la evocación se define como la reactivación de un trazo latente que guía la conducta, mientras que una explicación cognoscitiva considera que la evocación se puede derivar de la interacción entre la información almacenada e información recuperada en una condición contextual particular (Moscovitch, 2007; Roediger, 2007).

Se sabe que la evocación desencadena cambios moleculares en el cerebro; por ejemplo, se ha demostrado que evocar desencadena la fosforilación de proteínas cinasas, la activación de factores de transcripción y alteraciones en la expresión de genes en el sistema nervioso de animales (Sweatt, 2007). Algunos de los cambios moleculares que han sido asociados a la evocación involucran

---

<sup>1</sup>Memoria a largo plazo: Memoria de acontecimientos que ocurrieron en un pasado lejano, por contraposición a la *memoria de corto plazo*; la diferencia entre ambos tipos se distingue por los cambios plásticos y eventos neuroquímicos que generan la síntesis de nuevas proteínas (Squire y Kandel, 2009).

las mismas vías moleculares que son activadas durante la consolidación de la memoria. Así, el proceso de evocación es un evento trascendente a nivel molecular.

### **Investigación clínica y experimental de la memoria**

La distinción de los procesos de la memoria -almacenamiento, consolidación y evocación- surgió a partir de la investigación clínica y experimental. A mediados de los años cincuenta, el neurocirujano Wilder Penfield realizó estimulaciones eléctrica en la superficie cortical del lóbulo temporal de pacientes con epilepsia, las estimulaciones desencadenaron *respuestas vivenciales* en forma de recuerdos coherentes sobre imágenes, sonidos u otras percepciones mentales previamente experimentadas (Halgren, Walter, Cherlow y Crandall, 1978), siendo éste, uno de los primeros indicios de que el lóbulo temporal es importante para la evocación de la memoria.

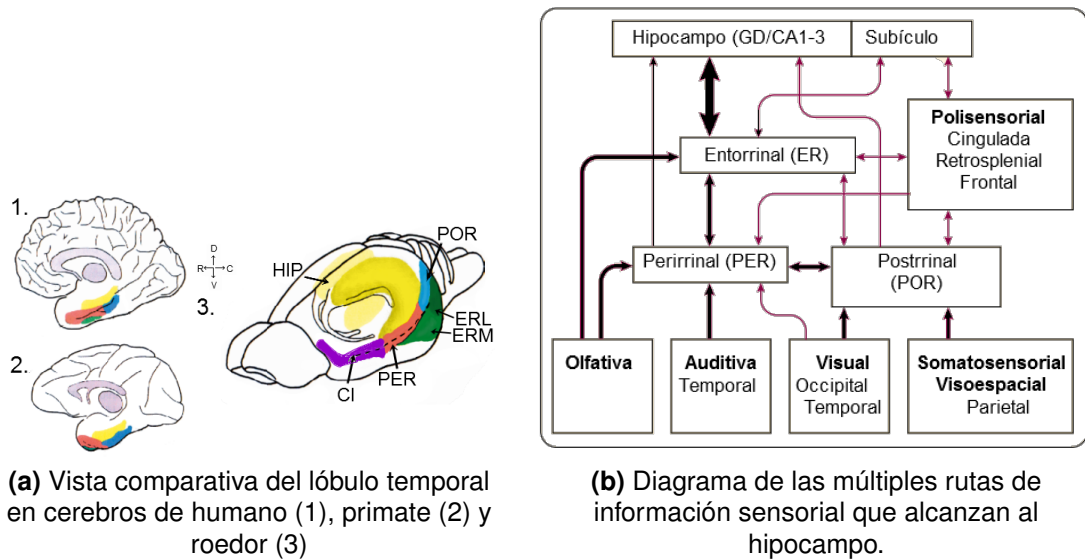
Las evidencias más convincentes de la importancia del lóbulo temporal en los procesos de la memoria emergen por los reportes de la Dra. Brenda Milner, en lo cuales destacó los severos efectos amnésicos producidos por la remoción parcial de los lóbulos temporales en el paciente H.M. (Milner y Taylor, 1972; Scoville y Milner, 1957). H.M. podía evocar información obtenida remotamente en su vida, pero era incapaz de recordar eventos ocurridos recientemente; por ejemplo, no podía reconocer después de pocos minutos información acerca de personas, lugares u objetos.

La información sobre personas, objetos o lugares responde a las preguntas *qué*, *dónde* o *cuándo* y la memoria constituida por este tipo de información se denomina *memoria episódica*<sup>2</sup>. En condiciones naturales, los animales presentan memorias de tipo episódicas indispensables para sobrevivir. En condiciones de laboratorio, se han emulado alteraciones similares a las observadas en el paciente H.M. principalmente en primates y roedores. Dichos modelos animales conservan, de forma similar a los humanos, las estructuras que conforman el ló-

---

<sup>2</sup>Memoria episódica: Capacidad de adquirir y recordar experiencias o episodios personales; los recuerdos se construyen con información de los estímulos, información del contexto e información temporal en que ocurren, por lo que responden a las preguntas *-qué, dónde y cuándo-* (Dere, Kart-Teke, Huston y De Souza Silva, 2006).

bulo temporal (ver figura 1.1a), los hipocampos (HIP) y sus cortezas adyacentes, corteza insular (CI) perirrinal (PER), entorrinal (ER) subdividida en dos dominios entorrinal lateral y entorrinal medial y la corteza postrrinal (POR) equivalente a la corteza parahipocampal de primates y humanos. Brown y Aggleton (2001) indican que en el lóbulo temporal del roedor, la información sensorial llega al HIP por diferentes vías (ver figura 1.1b).



**Figura 1.1** El lóbulo temporal y vías entre sus diferentes estructuras. (a) En el esquema del cerebro de roedor se distinguen: hipocampos (HIP); surco rinal (línea punteada); cortezas insular (CI), perirrinal (PER), postrrinal (POR), entorrinal lateral (ERL) y medial (ERM). (b) En el diagrama de conexiones, el grosor de las flechas indica el tamaño de las proyecciones. Modificado de Clark y Squire (2010) y Brown y Aggleton (2001).

## Neurotransmisión en el hipocampo

La neurotransmisión química es la principal forma de comunicación entre las células del sistema nervioso por la variedad de señales que transmiten y la complejidad de reacciones que generan. Utilizaremos el término *neurotransmisor* indistintamente para hacer referencia a los neurotransmisores clásicos, neuro-moduladores o cotransmisores que tienen la función de transmitir información de una célula presináptica a una postsináptica por la activación de receptores.

Los neurotransmisores se sintetizan a partir de precursores, se almacenan en vesículas y liberan al espacio sináptico para difundirse e interactuar con receptores específicos que producen alteraciones en la conductancia de la neurona postsináptica. La concentración del neurotransmisor dentro de las



vesículas suele ser alta (50-100 mM) pero al liberarse y difundirse, además de interaccionar con receptores ionotrópicos y metabotrópicos, interaccionan con enzimas de degradación y regulación que disminuyen rápidamente la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico, así la concentración del neurotransmisor varía en distintas regiones cerebrales (Kandel y Siegelbaum, 2000; Stanford, 2001). Además, algunos neurotransmisores se caracterizan por emplear vesículas de reciclaje para reponer y liberar nuevamente el neurotransmisor (Holz y Fisher, 2006). La demora de tiempo en que se realiza todo el proceso suele durar varios milisegundos.

En la tabla 1.1 se resumen las aferencias que recibe el HIP desde otras estructuras cerebrales y los principales neurotransmisores que se liberan. En el circuito interno del HIP (subregiones CA1, CA3 y el giro dentado) la neurotransmisión por GLU, GABA y ACh se expresan ampliamente en las neuronas piramidales e interneuronas.

**Tabla 1.1** Principales sistemas de neurotransmisión en el hipocampo.

Clasificación*	Grupos	Neurotransmisor		Región	Función
<i>Aminoácidos</i>	Carboxilo + amina primaria	Glutamato	GLU	Entorrinal	Excitatorio
		Ácido $\gamma$ -amino-butírico	GABA	Área septal	Inhibitorio
<i>Catecolaminas</i>	Catecol+amina primaria	Dopamina	DA	Área ventral tegmental	neuromodulador
		Norepinefrina	NE	Locus coeruleus	neuromodulador
	Catecol + amina secundaria	Epinefrina	E		
<i>Indolaminas</i>	Indol+amina primaria	Serotonina	5-HT	Núcleos de rafé	neuromodulador
<i>Acetilcolina</i>	Amina cuaternaria	Acetilcolina	ACh	Área septal	neuromodulador

\* Clasificación basada en grupos amino. Modificado de Cooper y Lowenstein (2002) y Sweatt (2010)

Mientras que fibras provenientes del locus coeruleus, núcleos de rafé y el área ventral tegmental proyectan al HIP dopamina (DA) serotonina y norepinefrina (NE), respectivamente (Cooper y Lowenstein, 2002). Por lo tanto, en el HIP se producen efectos rápidos en la conductancia de las membranas, así como efectos complejos y de larga duración en las propiedades celulares.

## **Memoria de reconocimiento**

El paciente H.M. como otros pacientes con lesiones severas en el lóbulo temporal medial presentan alteraciones en la memoria de reconocimiento. La *memoria de reconocimiento* se define como la capacidad para identificar si un estímulo o evento particular ha sido experimentado previamente.

La memoria de reconocimiento se caracteriza por experimentar dos tipos de recuerdos: el *componente del recuerdo contextual* y el *componente de familiaridad*. El primero nos permite experimentar el recuerdo vívido de detalles espacio temporal asociados con una experiencia previa; en cambio, por el componente de familiaridad experimentamos un inmediato sentido de previa ocurrencia, sin que el recuerdo nos proporcione información sobre el contexto en el que se experimentan los estímulos (Davis y cols., 2010; Squire, Stark y Clark, 2004; Squire, Wixted y Clark, 2007). Como ocurre en las memorias episódicas, el componente de familiaridad responden a la pregunta ¿qué?; en tanto, el componente contextual responde a las preguntas ¿dónde? y ¿cuándo?.

## **Reconocimiento espontáneo de objetos**

Entre los paradigmas que evalúan la memoria de reconocimiento en modelos animales destacan el *reconocimiento de olores*, el *condicionamiento de aversión a sabores* y el *reconocimiento espontáneo de objetos*. Éste último, permite disociar los dos componentes de la memoria de reconocimiento aprovechando la atracción natural que demuestran los roedores hacia estímulos novedosos, incluyendo una dimensión novedosa espacial o temporal (Hughes, 2007). El reconocimiento espontáneo de objetos se adquiere por aprendizaje incidental<sup>3</sup>, lo que puede generar menos estrés comparado con paradigmas que requieren reglas de adquisición y entrenamiento mantenido por reforzadores (Murai, Okuda, Tanaka y Ohta, 2007).

---

<sup>3</sup>Aprendizaje incidental: la adquisición de información ocurre por la capacidad de atender a la entrada sensorial de información, sin brindar instrucciones que indiquen la posterior evaluación, el propósito del aprendizaje u otro tipo de orientación para inducirlo (Roediger, Zaromb y Goode, 2008).

## Secuencia de ejecución

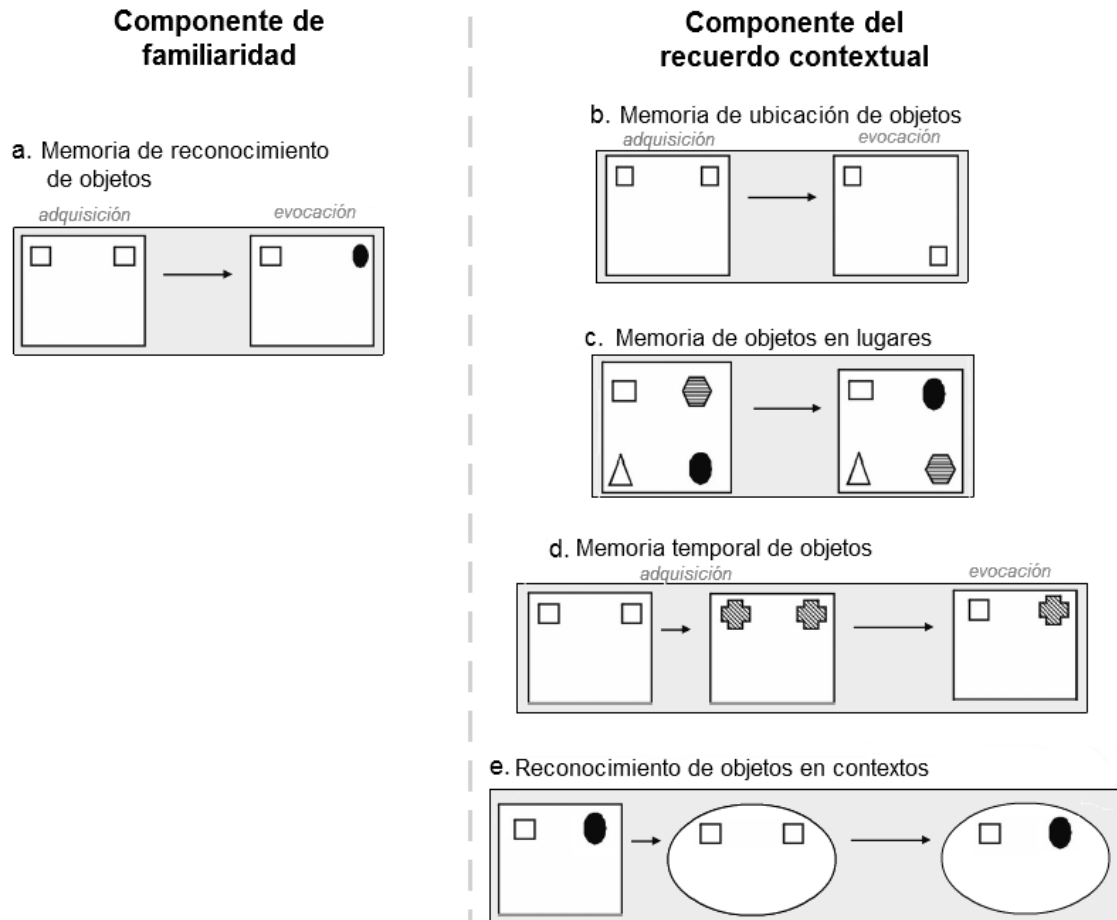
Generalmente en el reconocimiento espontáneo de objetos las pruebas se realizan en arenas cuadradas y constan de dos fases, en la *fase de adquisición* o *muestra* se colocan dos objetos como mínimo, permitiendo la libre exploración de los mismos. Los roedores tienen la capacidad de almacenar esa experiencia en una sesión, pero varias sesiones prolongan la permanencia del recuerdo. A la fase de adquisición sigue un *intervalo de tiempo* variable según el plazo de memoria que se pretenda evaluar. Posteriormente se realiza la *fase de evocación* o *elección* cambiando la configuración inicial de los objetos (Forwood, Winters y Bussey, 2005). Para una ejecución exitosa, los roedores deben reconocer las discrepancias entre la representación almacenada y la nueva configuración; así la memoria se traduce y cuantifica por el número de exploraciones a los estímulos, duración de las mismas o el tiempo empleado en cada cuadrante de la arena. La cuantificación de la conducta se considera un indicador confiable de la memoria por implicar aprendizaje incidental y porque la conducta es motivada por pocas exposiciones a los estímulos; sin embargo, es común observar un amplio grado de variabilidad entre individuos (Winters, Saksida y Bussey, 2008).

## Tipos de tareas dependientes del componente a evaluar

Si el objetivo es evaluar el componente de familiaridad se emplea la tarea ***memoria de reconocimiento de objetos*** que en su fase de evocación reemplaza un objeto por otro diferente nunca antes experimentado (fig. 1.2 a). Pero si el objetivo es evaluar el componente contextual, existen varias tareas que manipulan la información contextual o temporal. La tarea ***memoria de ubicación de objetos*** en su fase de evocación, coloca un objeto ya familiar en una nueva ubicación (fig. 1.2 b) los sujetos utilizan una estrategia basada en información espacial y referencias alocéntricas<sup>4</sup>; por lo que, las características propias de los objetos pueden ser secundarias (Gaskin, Tardif y Mumby, 2011; Mumby, Gaskin, Glenn, Schramek y Lehmann, 2002; Warburton y Brown, 2010). La ***memoria temporal de objetos*** requiere la capacidad para diferenciar el orden temporal de presentación de los objetos, en su fase de evocación los roedores tienden a explorar por menos tiempo los objetos presentados recientemente por

<sup>4</sup>Referencia alocéntrica: Referencia centrada al exterior del cuerpo del sujeto, pueden ser claves distales o locales a un contexto que sean usadas como referencia para la navegación espacial (Binder, Hirokawa y Windhorst, 2009).

un efecto de recencia<sup>5</sup> (fig. 1.2 d) (Barker y Warburton, 2011). Algunas tareas comprometen ambos componentes porque evalúan la asociación del *que en donde*, ya sea que dos objetos intercambien ubicaciones, como en la **memoria de objetos en lugares** (fig. 1.2 c); o bien, que se pruebe la asociación de cada objeto con un contexto particular, **reconocimiento de objetos en contextos** (fig. 1.2 e) (Dix y Aggleton, 1999).



**Figura 1.2** Secuencia esquemática de las tareas de reconocimiento en las diferentes fases y contextos. Se representa la configuración de los objetos (figuras) durante cada fase -adquisición o evocación-; y el intervalo de tiempo entre fases (flechas). Modificado de Balderas y cols. (2008); Barker y Warburton (2011, 2013); Bussey y cols. (2000).

La combinación entre los paradigmas desarrollados y el análisis de los sistemas cerebrales involucrados en la memoria de reconocimiento se ha vuelto una prominente línea de investigación porque permiten examinar los mecanismos sinápticos comprometidos con los distintos tipos de información, que además,

<sup>5</sup>Efecto de recencia: efecto ligado al orden de presentación de los elementos en una serie de ítems, explica que se retienen mejor los ítems presentados en último lugar (Bredart, 2008).

correspondan a los distintos procesos de la memoria. Más aún, la investigación en ratones presenta importantes implicaciones para aproximaciones celulares, moleculares y genéticas de la memoria.

## 2 Antecedentes

### 2.1 Disociación funcional en el lóbulo temporal

Inicialmente, en el lóbulo temporal de diversas especies de roedores, se observó que lesiones neurotóxicas en PER afectan la tarea que evalúa el componente de familiaridad; sin alterar la memoria espacial en tareas como el laberinto acuático, el laberinto radial o el laberinto en T (Bussey, Muir y Aggleton, 1999; Ennaceur, Neave y Aggleton, 1996). Sucesivos estudios han mapeado a los componentes de la memoria de reconocimiento en las distintas estructuras del lóbulo temporal, particularmente utilizando los paradigmas de reconocimiento espontáneo de objetos (Bussey y cols., 2000; Ennaceur, Neave y Aggleton, 1997; Mumby y cols., 2002; Warburton, Baird, Morgan, Muir y Aggleton, 2000).

Las evidencias coinciden en que lesiones neurotóxicas en el HIP afectan significativamente el componente del recuerdo contextual, pero producen pocos efectos en la evaluación de la familiaridad. Mientras que lesiones en corteza PER produce severos efectos al evaluar el componente de familiaridad, pero los efectos en el componente contextual son limitados; por tanto, los componentes de la memoria de reconocimiento pueden ser disociables anatómicamente. A pesar de encontrar amplios antecedentes, la *disociación de la memoria de reconocimiento* aún genera controversias (Broadbent, Squire y Clark, 2004; Cowell, Bussey y Saksida, 2010; Squire y cols., 2007).

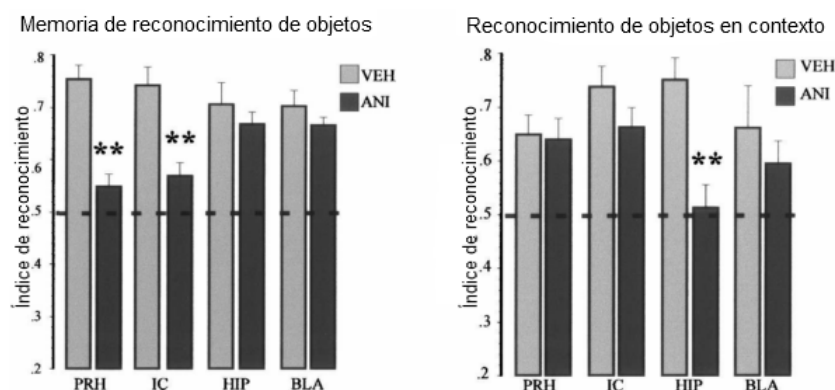
Si bien, las lesiones permanentes en el cerebro de roedor permiten explicar el fundamento anatómico de la memoria de reconocimiento, no permiten identificar su participación en los procesos de memoria -adquisición, consolidación o evocación-.

### 2.1.1 Actividad del hipocampo en la memoria de reconocimiento

En los últimos años se han empleado bloqueos temporales y reversibles en distintas regiones del cerebro de roedor para examinar la dependencia anatómica del lóbulo temporal en la consolidación y evocación de la memoria de reconocimiento; ejemplos de lo anterior, es el uso de bloqueadores de canales iónicos, fármacos antagonistas o inhibidores de la síntesis de proteínas (Balderas y cols., 2008; Gaskin y cols., 2011; Haettig y cols., 2011; Oliveira, Hawk, Abel y Havekes, 2010).

### Inactivación del hipocampo durante la consolidación de la memoria

La disociación de los componentes de la memoria de reconocimiento se ha evaluado durante la consolidación de la memoria. Balderas y cols. (2008) administraron un inhibidor de la síntesis de proteínas (anisomicina) en distintas regiones del lóbulo temporal de ratas durante el intervalo entre fases del *reconocimiento de objetos en contexto* y en la *memoria de reconocimiento de objetos* (fig. 2.1). Como esperaban los autores, la consolidación en el HIP fue necesaria para reconocer la nueva asociación de un objeto con un contexto, mientras que el reconocimiento de la familiaridad requirió sólo de la CI y la PER.



**Figura 2.1** Bloqueo durante la consolidación de la memoria de reconocimiento. Índice de reconocimiento que se obtiene al bloquear la síntesis de proteínas en distintas estructuras del lóbulo temporal. La administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas (anisomicina, ANI) en corteza perirrinal e insular altera la *memoria de reconocimiento de objetos*; mientras que en el hipocampo altera el *reconocimiento de objetos en contexto*, ambas evaluadas en un plazo de 24 h (\*\* $P < 0.01$ ). Vehículo (VEH); corteza insular (IC); corteza perirrinal (PER); hipocampo (HIP); amígdala basolateral (BLA). Modificado de Balderas y cols. (2008).

Además de que los resultados apoyan la disociación funcional de estructuras del lóbulo temporal, sugieren que la CI no es fundamental durante la consolidación de información contextual. Sin embargo, existen evidencias de que la CI participa en la formación de memorias contextuales y espaciales relacionadas con contenidos aversivos (Bermudez-Rattoni, Introini-Collison y McGaugh, 1991; Miranda y Bermúdez-Rattoni, 2007). Así la participación que pueda tener la CI ante la evocación de un recuerdo contextual no es clara.

En ratones de la cepa C57BL/6J, se probó la dependencia del HIP en la consolidación del reconocimiento contextual al administrar un agonista de los receptores *GABA<sub>A</sub>* (muscimol) posterior a la fase de adquisición de la tarea *memoria de ubicación con tres objetos*, resultando en un pobre reconocimiento del objeto en la nueva ubicación. En cambio, al administrar el fármaco y probar la *memoria de reconocimiento de objetos* la inactivación del HIP mejoró la ejecución de la tarea (Oliveira y cols., 2010).

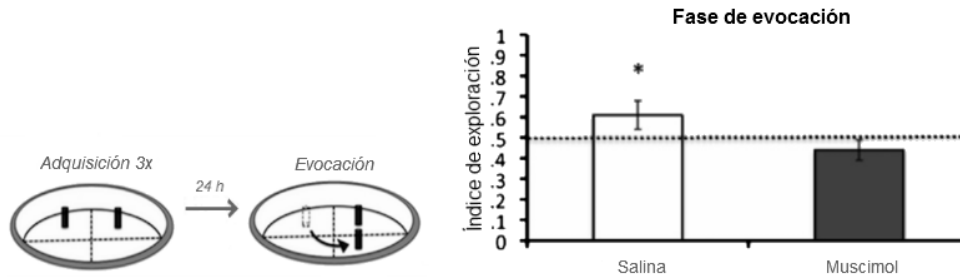
Los reportes antes mencionados indican que el HIP tiene un papel fundamental para el proceso de consolidación en las tareas *reconocimiento de objetos en contexto* y *memoria de ubicación con tres objetos*. Es de interés observar, si el HIP también muestra dependencia funcional durante el proceso de evocación.

### **Inactivación del hipocampo durante la evocación de la memoria**

La disociación de los componentes de la memoria de reconocimiento también se ha evaluado durante la fase de evocación de la memoria. Gaskin y cols. (2011) afectaron la evocación del reconocimiento contextual al administrar muscimol en el HIP dorsal e intermedio de ratas 30 min antes de la fase de evocación en la *memoria de ubicación de objetos*. La administración del fármaco impidió el reconocimiento del objeto en la nueva ubicación, a pesar de que la fase de adquisición se repitió por tres días consecutivos (fig. 2.2). Por lo tanto, los autores sugieren que el HIP es esencial al tiempo en que los sujetos evocan información contextual.

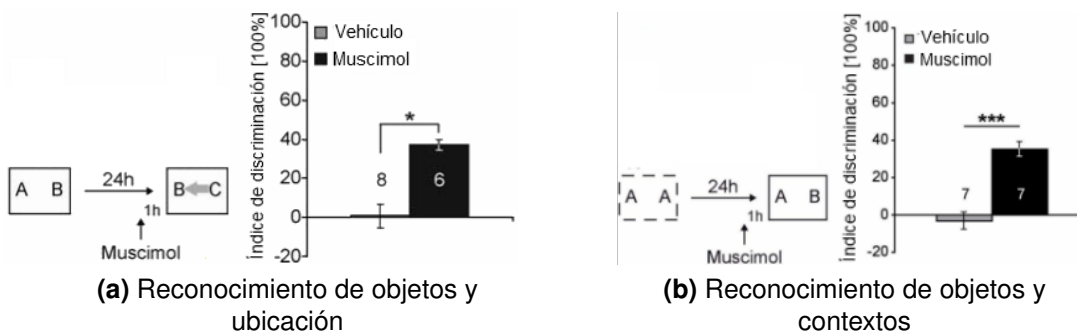
En otro estudio realizado en ratones de la cepa C57BL/6J, se probaron los efectos de inyectar muscimol en el HIP dorsal previo (1 h) a la fase de evocación





**Figura 2.2** Inactivación del HIP en la *memoria de ubicación de objetos*. Representación del protocolo empleado y gráfica que indica el índice de exploración para los grupos que recibieron salina o muscimol previo a la fase de evocación de la *memoria de ubicación de objetos*, evaluada después de 24 h. El grupo de ratas inyectado con muscimol no reconoció el objeto desplazado a una nueva ubicación (\* $P < 0.05$ ). Tres sesiones de la fase de adquisición (Adquisición 3x). Modificado de Gaskin y cols. (2011).

en un protocolo que simultáneamente evalúa las tareas de *reconocimiento de objetos* y *memoria de ubicación de objetos*. Por la forma simultánea de activar ambos componentes, el grupo control no debe mostrar diferencias entre las exploraciones del objeto novedoso y en objeto en la nueva ubicación; sin embargo, el grupo inyectado con muscimol exploró por más tiempo el objeto novedoso respecto al objeto desplazado de ubicación (fig. 2.3a). Los autores reportan que el efecto no fue específico de la tarea porque se obtuvieron resultados similares en el protocolo que simultáneamente evaluó el *reconocimiento de objetos* y el *reconocimiento de contexto* (fig. 2.3b).



**Figura 2.3** Inactivación del HIP en tareas simultáneas. (a) Protocolo para el *reconocimiento de objetos y de ubicación*. (b) Protocolo para el *reconocimiento de objetos y de contextos*. Índice de discriminación entre los grupos inyectados con vehículo o muscimol, éste último muestran alteraciones en el componente contextual, pero no en el componente de familiaridad (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Letras (A, B y C) indican objetos; flecha gris indica objeto familiar desplazado de ubicación; flechas horizontales indican intervalo entre fases; flecha vertical indica administración del fármaco; número en barras indican sujetos. Modificado de Haettig y cols. (2011).

Los resultados se interpretan en que la inhibición del HIP impidió la evocación del recuerdo contextual, mientras que se conserva la capacidad de reconocer el componente de familiaridad debido a que las regiones que lo soportan permanecen intactas (Haettig y cols., 2011).

En conclusión, las evidencias expuestas sugieren que el HIP participa activamente en la evocación del componente contextual al evaluar distintas tareas de reconocimiento espontáneo de objetos. Actualmente, el estudio de la memoria de reconocimiento requiere profundizar en los mecanismos neuroquímicos que subyacen a las regiones cerebrales.

### **2.1.2 Neurotransmisión de la memoria de reconocimiento**

Analizar la neurotransmisión en el HIP y las cortezas adyacentes permite identificar el tipo de transmisión y modulación que se requiere al tiempo en que roedores adquieren, consolidan o evocan información comprometida con el componente contextual o el de familiaridad; y en consecuencia, proveer información que permita indagar la actividad funcional que tienen los neurotransmisores sobre la memoria de reconocimiento. Es considerable la cantidad de reportes que prueban los efectos por manipulaciones farmacológicas en las tareas de reconocimiento espontáneo de objetos. Más aún, las evidencias indican que a nivel de neurotransmisión es posible observar la disociación funcional en el HIP y en las CI y PER según el componente de la memoria de reconocimiento a evaluar (ver tabla 2.1).

#### **Participación de la dopamina y norepinefrina en la memoria de reconocimiento**

La administración sistémica de un agonista de los receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub> (SKF 81297) previo a la fase de evocación mejoró el reconocimiento en la *memoria de ubicación de objetos* evaluada a largo plazo (4 h), con efectos similares en la *memoria de reconocimiento de objetos* y en la *memoria temporal de objetos*. Tales resultados sugieren que los receptores D<sub>1</sub> tienen un efecto modulador cuando se evoca información independientemente de la naturaleza de la misma. Los autores sugieren que por la ausencia de alte-

**Tabla 2.1** Efectos de los fármacos en diferentes fases de las tareas de reconocimiento.

<i>Referencia</i>	<i>Modelo</i>	<i>Actividad (fármaco)</i>	<i>Admón.</i>	<i>Fase<sup>1</sup></i>	<i>Tarea</i>	<i>Efecto</i>	<i>Intervalo</i>	
Hotte, Naudon y Jay (2005)	ratas macho Sprague-Dawley	agonista receptores D <sub>1</sub> (SKF81297)	i.p	FE	Memoria de ubicación de objetos	mejora	4 horas	
				FE	Memoria temporal de objetos	mejora		
				FE	Memoria de reconocimiento de objetos	mejora		
Vago y Kesner (2008)	ratas macho Long-Evans	agonista DA no selectivo (apomorfina)	CA1	FA	Memoria de objetos en lugar	afecta	3 min	
				CA3	FA	Memoria de objetos en lugar		-
				Cortical	FA	Memoria de objetos en lugar		-
				HIP	FA	Memoria de reconocimiento de objetos		-
Guzmán-Ramos y cols. (2012)	ratones macho 3xTg-AD	inhibidor de la recaptura DA (nomifensina)	CI	FA	Memoria de reconocimiento de objetos	recuperación	90 min y 24 h	
Barker y Warburton (2013)	ratas macho pigmentadas	antagonista receptores NMDA (AP-5)	HIP	FA	Memoria de ubicación de objetos	afecta	5 min y 1 h	
				FA	Memoria de objetos en lugar	afecta		
				FA	Memoria de reconocimiento de objetos	-		
		HIP-CPFm	FE	Memoria de objetos en lugar	-			
		HIP-PER	FE	Memoria de objetos en lugar	-			
		antagonista receptores AMPA (NBQX)	HIP-CPFm	FE	Memoria de objetos en lugar	afecta		
HIP-PER	FE	Memoria de objetos en lugar	afecta					
Barker y cols. (2006)	ratas macho pigmentadas	antagonista receptores NMDA (AP-5)	PER	FE	Memoria de reconocimiento de objetos	-	20 min, 3 o 24 h	
Winters y Bussey (2005)	ratas macho Lister	antagonista receptores AMPA (CNQX)	PER	FE	Memoria de reconocimiento de objetos	afecta	3 h	
				antagonista receptores NMDA (AP-5)	PER	FE		Memoria de reconocimiento de objetos
Winters, Saksida y Bussey (2006)	ratas macho Lister	antagonista receptores muscarínicos (escopolamina)	PER	FE	Memoria de reconocimiento de objetos	-	24 h	

La tabla resume estudios en los que se ha evaluado el efecto de los fármacos dopaminérgicos, glutamatérgicos y colinérgicos sobre tareas de reconocimiento espontáneo de objetos.

<sup>1</sup> Fase de adquisición (FA); fase de evocación (FE)

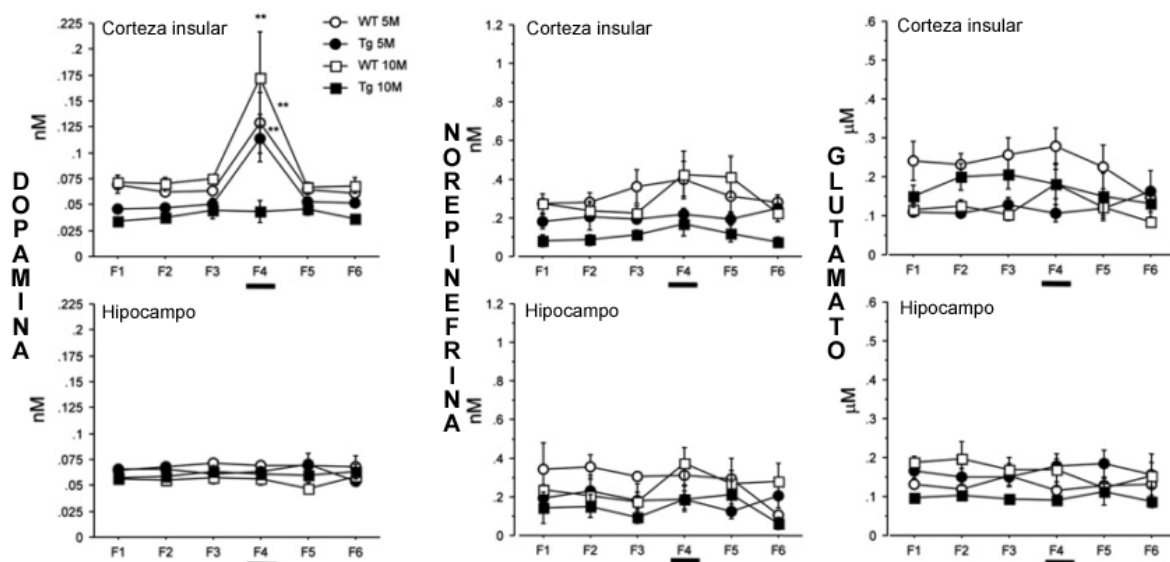
raciones en la actividad locomotora y la conducta exploratoria, los efectos del fármaco están relacionados con los procesos cognoscitivos (Hotte y cols., 2005).

Las manipulaciones farmacológicas sobre el HIP precisan la participación que puede tener esta región al evocar el componente contextual. Vago y Kesner (2008) alteraron la transmisión hipocampal con un agonista dopaminérgico no selectivo (apomorfina) durante un protocolo modificado de la *memoria de objetos en lugares* evaluada a intervalos cortos. Encontraron que el fármaco inyectado en CA1, y no en CA3 o en la corteza superior al HIP, alteró el reconocimiento del objeto desplazado a una ubicación familiar y del objeto desplazado a una nueva ubicación. Los mismos grupos experimentales mostraron exploraciones normales en la *memoria de reconocimiento de objetos*, lo que significa que incrementar la actividad dopaminérgica en la región CA1 del hipocampo altera el reconocimiento contextual, pero no la familiaridad de los estímulos.

Los fármacos dopaminérgicos empleados en los estudios de Hotte y cols. (2005) y Vago y Kesner (2008) producen efectos heterogéneos dependientes del plazo de la memoria, el tipo de tarea y la forma de administrar el fármaco; a pesar de ello, ambos destacan la participación dopaminérgica durante la fase de evocación del componente contextual. Además, no encontramos algún antecedente que emplee antagonistas de DA al evocar información contextual en las tareas de reconocimiento espontáneo de objetos. Por lo tanto, no es clara la participación dopaminérgica en el HIP durante la evocación del componente contextual de la memoria de reconocimiento.

En las fases de evocación de las tareas de reconocimiento, los sujetos deben experimentar la adquisición de nueva información, ya sea de un objeto o de una nueva configuración contextual o temporal. En el caso de la evaluación del componente de familiaridad, debe adquirirse nueva información de un objeto, el objeto novedoso; en el caso del componente contextual se debe adquirir información de una nueva modificación contextual o temporal. Guzmán-Ramos y cols. (2012) comprobaron que la DA de la CI es crítica para la adquisición de nuevos estímulos. Utilizando microdiálisis en libre movimiento en ratones control de la cepa B6129SF2/J de 5 y 10 meses de edad, encontraron que la concentración de DA extracelular incrementó en la CI y no en el HIP durante la fase de adquisición de la *memoria de reconocimiento de objetos*. La liberación

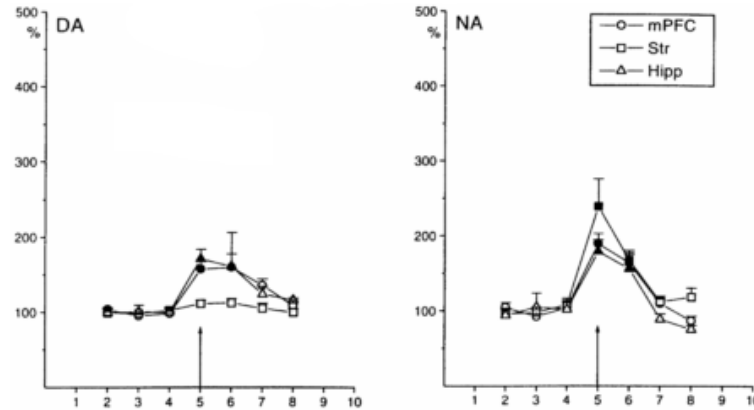
dopaminérgica se relacionó con la subsecuente capacidad para diferenciar objetos familiares versus novedosos dado que un grupo de ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer no presentó tal incremento dopaminérgico y sí deficiencias en la fase de evocación. De forma interesante, la memoria a corto y largo plazo de los sujetos transgénicos se recuperó al administrar un inhibidor de la recaptura de DA previo a la fase de adquisición. También se analizó la concentración extracelular de NE al adquirir los dos estímulos novedosos, sin encontrar cambios significativos en el HIP o en la CI de los sujetos control (fig. 2.4).



**Figura 2.4** Neurotransmisión durante la adquisición de la *memoria de reconocimiento de objetos*. Monitoreo de la concentración de dopamina, norepinefrina y glutamato en el hipocampo y corteza insular antes, durante y después de la fase de adquisición de la *memoria de reconocimiento de objetos*. Los grupos control (WT) y el grupo de ratones transgénicos de 5 meses de edad aumentaron la concentración extracelular de dopamina al tiempo en que exploran dos objetos novedosos (\*\* $P < 0.01$  vs la línea basal). Wild type 5 meses de edad (WT 5M) y 10 meses (WT 10M); transgénicos 5 meses (Tg 5M) y 10 meses (Tg 10M); líneas basales (F1, F2 y F3); fase de adquisición (F4); posteriores a la adquisición (F5 y F6). Modificado de Guzmán-Ramos y cols. (2012).

Otro estudio también destaca la participación de la DA, pero durante la adquisición de nueva información contextual; es decir, al retirar a ratones de la cepa C57BL/6J de su caja en que habitan y colocarlos en un nuevo contexto por 16 min, tiempo en que se recuperaron las muestras del microdializado proveniente del HIP, estriado y corteza prefrontal se reportó un incremento significativo, respecto a las líneas basales, de cerca del 150% de DA y menos del 200% de

NE en el HIP, similar al registrado en las otras regiones examinadas (fig. 2.5) (Ihalainen, Riekkinen y Feenstra, 1999).



**Figura 2.5** Efecto de la exposición ante novedad contextual. Liberación del neurotransmisor (%) antes, durante y después de la exposición a un nuevo contexto. Los resultados indican que durante la exposición a un nuevo contexto incrementa la liberación de dopamina en el hipocampo y la corteza prefrontal medial; mientras que la norepinefrina incrementa su liberación en el hipocampo, estriado y corteza prefrontal medial. Las flechas indican exposición de novedad contextual; dopamina (DA); norepinefrina (NA); hipocampo (Hipp); estriado (Str); corteza prefrontal medial (mPFC). Modificado de Ihalainen y cols. (1999).

Así, las evidencias indican que objetos novedosos incrementan los niveles de DA en la CI, mientras estímulos novedosos de tipo contextual incrementan los niveles de DA y NE en el HIP.

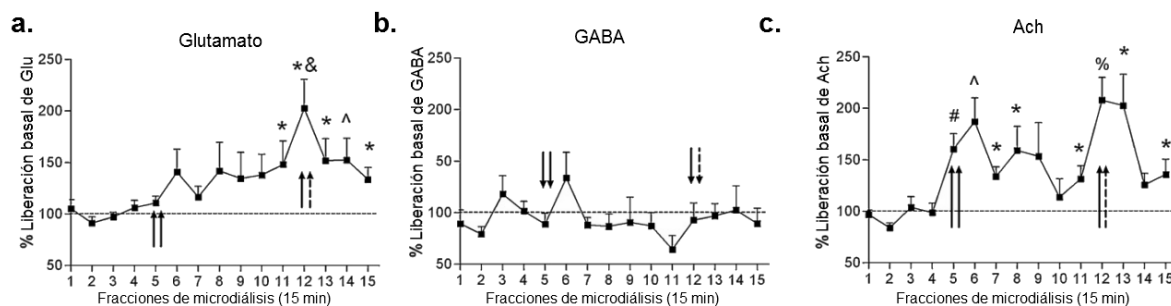
No encontramos registros que examinen con precisión el efecto que pueda tener la manipulación de los receptores noradrenérgicos del HIP o de la CI durante la evocación del componente contextual; por lo mismo, sería importante un primer acercamiento a la dinámica en que se libera la NE en ambas regiones.

### Participación de glutamato y GABA en la memoria de reconocimiento

GLU es un neurotransmisor excitatorio y GABA es un neurotransmisor inhibitorio, ambos están ampliamente distribuidos en el cerebro y en el HIP predominan las neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas. Por ello, sería interesante evidenciar la participación de GLU y GABA en una región, que se sabe, está comprometida con el componente del recuerdo contextual.

Barker y Warburton (2013) probaron antagonistas de los receptores AMPA (NBQX) y NMDA (AP-5) en dos tipos de bloqueos de forma contralateral en el cerebro de ratas, HIP/corteza prefrontal medial e HIP/PER. La administración de cada fármaco se realizó previo a la fase de evocación de la tarea *memoria de objetos en lugares*. Los autores reportan que la actividad de los receptores AMPA, y no NMDA, en ambos tipos de bloqueo alteraron el reconocimiento de los objetos que intercambian lugar.

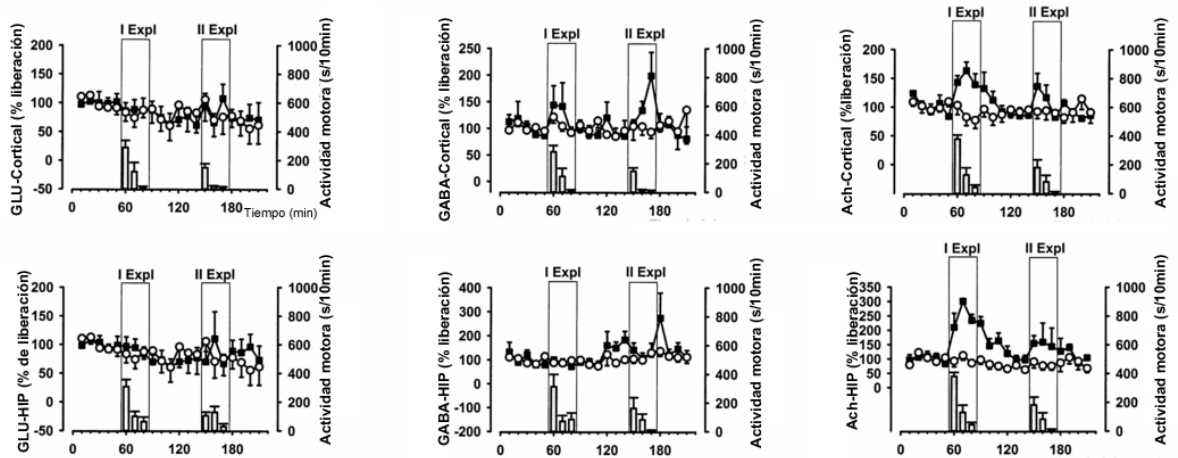
Mediante el monitoreo del GLU en la *memoria de reconocimiento de objetos* se ha reportado que, al tiempo en que ratas experimentan una repetida presentación de objetos familiares (5° adquisición), no se observan cambios significativos en su dinámica de liberación en el HIP (fig. 2.6) (Stanley, Wilson y Fadel, 2012).



**Figura 2.6** Análisis neuroquímico en el hipocampo durante la *memoria de reconocimiento de objetos*. Porcentaje del flujo de liberación de los neurotransmisores antes, durante y después de las fases de adquisición y evocación. (a) El glutamato hipocampal incrementa significativamente durante la fase de evocación, (b) mientras que la liberación de GABA se mantiene estable, (c) acetilcolina en el hipocampo incrementa significativamente en varios momentos del protocolo (\* $P \leq 0.05$ , ^ $P \leq 0.005$ , # $P \leq 0.001$ , % $P \leq 0.0001$  vs la fracción 4; & $P \leq 0.05$  vs fracción 5). Quinta adquisición de objetos familiares (dobles flechas lisas); fase de evocación (dobles flechas punteadas); acetilcolina (ACh). Modificado de Stanley y cols. (2012).

En otro estudio se reporta que ante la repetida presentación de contextos (2° adquisición) tampoco se observaron cambios en la liberación de GLU en el HIP o en la corteza frontal (fig. 2.7) (Giovannini y cols., 2001). En el reporte de Guzmán-Ramos y cols. (2012) también se describió la liberación de GLU ante la exploración de objetos novedosos, sin encontrar alteraciones en el HIP o en la CI de ratones control. Giovannini y cols. (2001) tampoco reportan cambios en la liberación de GLU en el HIP o la corteza frontal de rata, ante la exploración de un nuevo contexto (fig. 2.7) (Giovannini y cols., 2001). Así, la actividad glutamatérgica en el HIP, corteza frontal o CI no se ha relacio-

nado con la novedad de estímulos o contexto, ni con la habituación a los mismos.



**Figura 2.7** Efecto de la exposición ante novedad contextual.

Porcentaje de liberación de los neurotransmisores glutamato, GABA y acetilcolina en corteza e hipocampo; así como la actividad motora de los sujetos al experimentar un contexto durante la exploración I y II. La actividad de GABA en el HIP incrementa durante la exposición II. Durante las dos exploraciones consecutivas se observa un incremento de acetilcolina cortical e hipocampal. Glutamato (Glu); acetilcolina (Ach); Exploración de un nuevo contexto (I Expl); repetida exposición a los contextos (II Expl). Modificado de Giovannini y cols. (2001).

Stanley y cols. (2012) observaron que GLU en el HIP incrementó su concentración extracelular cerca de dos veces respecto a la línea basal a la vez que los sujetos reconocieron en forma exitosa un objeto nuevo frente a otro familiar, es decir, durante la fase de evocación de la *memoria de reconocimiento de objetos* evaluada a corto plazo (fig. 2.6). El incremento de GLU durante la evocación de estímulos indica, en primer lugar que a nivel neuroquímico el HIP participa en la evocación del componente de familiaridad; y en segundo lugar, nos permite hipotetizar que si evaluamos una evocación que depende en gran medida del HIP observaremos algún cambio en la dinámica de liberación del sistema glutamatérgico.

Pocos reportes exploran la función que las neuronas gabaérgicas ejercen en la memoria de reconocimiento. Stanley y cols. (2012) reportan que durante la *memoria de reconocimiento de objetos* no encontraron cambios en la liberación de GABA en el HIP durante una repetida presentación de estímulos, ni durante la fase de evocación (fig. 2.6). Tampoco se observó una clara relación ante la



exposición de novedad contextual y la liberación de GABA en el HIP (Giovannini y cols., 2001). Y un incremento en la liberación de GABA hipocampal se observa al tiempo en que ratas experimentan habituación contextual (fig. 2.7) (Giovannini y cols., 2001). Por lo tanto, GABA podría tener una participación secundaria durante la evocación de la memoria de reconocimiento, ya que durante esta fase los sujetos experimentan un reconocimiento que debe traducirse en un alto contenido de novedad y en el incremento de su actividad exploratoria.

En conclusión, encontramos que son limitados los reportes que evalúan la memoria de reconocimiento al inducir alteraciones por agentes farmacológicos durante la evocación de la memoria. Además los reportes que describen la dinámica de liberación de los neurotransmisores en las estructuras del lóbulo temporal se han realizado durante la formación de la memoria de reconocimiento, durante una evocación dependiente del componente de familiaridad y durante el procesamiento de información contextual novedosa, sin que a la fecha se describa la neuroquímica de una evocación dependiente de información contextual. Los antecedentes descritos apuntan que es relevante analizar a los neurotransmisores DA, NE y GLU al evaluar el componente contextual.

### 3 Planteamiento del problema

Estudiar los sustratos neuronales que subyacen a la memoria de reconocimiento ha sido necesario desde que se reportaron los primeros casos clínicos de amnesia anterógrada. La investigación en humanos y en modelos animales se ha centrado en que el HIP y las cortezas adyacentes son las principales estructuras que soportan la memoria de reconocimiento.

Originalmente en roedores se demostró, mediante técnicas que generan lesiones permanentes, que los componentes de la memoria de reconocimiento pueden ser disociables anatómicamente; así, el componente del recuerdo contextual muestra mayor dependencia por el HIP, mientras que el componente de familiaridad se muestra más dependiente de la CI y la corteza PER. Pero el uso de lesiones permanentes no distingue si la disociación de la memoria de reconocimiento se extiende a los procesos de la memoria -adquisición, consolidación y evocación-. Para abordar tal cuestión ha sido común el uso de manipulaciones farmacológicas reversibles. En general, mediante éste tipo de intervenciones, se han observado evidencias que sustentan la disociación de la memoria de reconocimiento; más aún, se ha producido abundantes evidencias de los mecanismos de neurotransmisión relacionado con el componente de familiaridad en comparación con los que subyacen al componente contextual. Además, mediante el monitoreo de la neurotransmisión en el cerebro de roedor, se han observado incrementos en la liberación de los neurotransmisores DA, NE y GLU en el HIP y en otras cortezas al tiempo en que los sujetos procesa información contextual o de familiaridad; sin embargo, estas evidencias no permiten concluir si la disociación de la memoria de reconocimiento se observa a nivel neuroquímico.

En este contexto, el objetivo principal de la presente investigación es describir la neurotransmisión asociada al procesamiento de información contextual; para lo cual, en primera instancia se debe estandarizar una de las tarea de

reconocimiento espontáneo de objetos. Una vez que se cumpla dicho objetivo, se realiza un monitoreo de la liberación de algunos neurotransmisores al tiempo en que se procesa la información contextual. El conocimiento que se genere sobre la dinámica de liberación de los neurotransmisores es de interés porque permitirá apoyar o rechazar la propuesta de la disociación de la memoria de reconocimiento desde una perspectiva neuroquímica. De igual forma, encontrar cambios en la actividad de algún neurotransmisor permitirá discutir su relevancia para funciones particulares. Finalmente, el conocimiento detallado de las bases neuroquímicas en el cerebro de ratón y no de otros roedores, en condiciones de salud, se fundamenta en la relevancia que presenta los ratones como modelo para la investigación en modelos de enfermedades.

### **3.1 Objetivo general**

Describir cambios en los niveles extracelulares de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA en el HIP y en la CI durante una modificación contextual, que corresponde a la fase de evocación de la memoria de reconocimiento evaluada a largo plazo en ratones de la cepa B6129SF2/J.

#### **Objetivos particulares**

- Evaluar y estandarizar, en grupos de ratones intactos, su desempeño en protocolos adaptados de las tareas *reconocimiento de objetos en contexto* y *memoria de ubicación de objetos*; a fin de identificar entre ellos aquél que brinde una evaluación válida y confiable del componente contextual, y que permita adaptar la técnica de microdiálisis en libre movimiento.
- Monitorear los niveles extracelulares de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA en un grupo de ratones con cánulas en el HIP y en la CI; a fin de analizar cambios en la neurotransmisión antes, durante o después de inducir de fase de evocación del protocolo estandarizado.

### **3.2 Hipótesis**

La modificación contextual inducida durante la fase de evocación de una tarea de reconocimiento se relacionará con cambios en la neurotransmisión en el HIP,

y no en la CI.

### 3.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental que incluyó varias *mediciones repetidas* de los niveles extracelulares previas y posteriores a evaluar la fase de evocación de una tarea, que evalúa el componente contextual en *un sólo grupo* de ratones (tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Diseño experimental

<i>Grupo</i>	<i>Líneas basales</i>			<i>Fase de evocación</i>		
<i>Hipocampo</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>
<i>Corteza insular</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>

En el grupo de ratones B6129SF2/J jóvenes con cánulas obtuvimos muestras de fluido cerebroespinal simultáneamente en el HIP y en la CI. Las muestras se dividen en seis fracciones (*F1-6*). Las muestras tomadas previo a inducir la fase de evocación, *F1*, *F2* y *F3*, se consideraron líneas basales (*LB*); *F4* representa la muestra obtenida durante la fase de evocación y posterior a ésta se recuperan dos muestras más, *F5* y *F6*.



## 4 Metodología experimental

Con el fin de describir cambios en los niveles extracelulares de los neurotransmisores durante la fase de evocación de una memoria de reconocimiento evaluada a largo plazo, se distinguen dos etapas metodológicas en el presente trabajo. La primera etapa tiene por objetivo evaluar diferentes paradigmas conductuales *-reconocimiento de objetos en contexto y memoria de ubicación de objetos-* con el fin de identificar aquel protocolo que permita un registro confiable de la memoria de reconocimiento; a partir del protocolo estandarizado y con validez en los resultados, entonces realizamos la segunda etapa de procedimientos con el objetivo de establecer un monitoreo de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA antes, durante y después a la fase de evocación de la tarea estandarizada.

### 4.1 Sujetos

Se utilizaron ratones de tipo silvestre de la cepa B6129SF2/J, producto del cruce entre hembras C57BL/6J (B6) y machos 129S1/SvImJ (129S). Los sujetos fueron proporcionados por el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Para la primera etapa de estandarización de protocolos conductuales se emplearon 20 ratones hembras intactas de diferentes edades divididas en cinco grupos y 47 ratones machos intactos de diferentes edades divididos en cuatro grupos. En tanto, para siguiente etapa de medición de los neurotransmisores se utilizó un grupo de 10 ratones machos de 5 meses de edad implantados con cánulas en el HIP y en la CI. A partir de la recuperación postquirúrgica de este último grupo, los animales fueron alojados individualmente. Todos los sujetos se alojaron en cajas de acrílico provistas con agua y alimento *ad libitum*. Todos los protocolos conductuales fueron conducido durante la fase luminosa de un ciclo controlado de luz/oscuridad 12:12 h.

## **4.2 Estandarización de tareas de reconocimiento espontáneo de objetos**

Los protocolos a evaluar deben cumplir con condiciones que, en una segunda etapa, permitan adaptar la técnica de microdiálisis. Las condiciones incluyen; el libre tránsito de los sujetos en un contexto delimitado para impedir el desplazamiento de las sondas de microdiálisis, pocas adquisiciones para evitar riesgos por la implantación de cánulas en el cerebro, sesiones breves pero con tiempo suficiente para recolectar muestras de fluido cerebroespinal, intervalos de tiempo largos (24 h) entre sesiones, protocolos que no involucren entrenamiento prolongado, sesgos motivacionales o emocionales u otros factores generadores de estrés que afecten la neurotransmisión, y finalmente un protocolo que implique modificaciones contextuales.

### **Aparatos y objetos**

Se emplearon seis objetos contruidos con bloques de plástico (Lego<sup>®</sup>, México) de dimensiones similares (fig. 5.1). Se utilizaron dos cajas experimentales cuadradas (33 cm de lado x 30 cm de alto) con paredes de madera y piso cubierto de aserrín, adherida a una de las paredes se ubicó una clave espacial (28 cm x 4 cm) con rayas verticales (b/n 1.5 cm) elevada a 2 cm del piso de la arena. Para la tarea *reconocimiento de objetos en contexto* adicionalmente se emplearon dos contextos circulares (25 cm diámetro) formados por paredes negras y bases de acrílico cubierto por aserrín. Los aparatos y los objetos se limpiaron con etanol 70 % previo al inicio de cada sesión, para cada sujeto y en cada uno de los protocolos conductuales. En todos los protocolos conductuales se balanceó la elección de los objetos, sus ubicaciones y/o los contextos, con el fin de reducir sesgos debido a la preferencia por algún objeto o alguna ubicación.

### **Estandarización de pares de objetos**

El protocolo para estandarizar cinco diferentes pares de objetos (*par 1 – 5*), se aplicó en ratones intactos, cinco grupos de ratones hembras (n=4) y un grupo de ratones machos (n=25) de diferentes edades. El protocolo consistió en aplicar tres días de habituación (5 min) a un contexto; después de un intervalo de 24

h, cada sujeto fue introducido de forma individual al contexto. Inmediatamente se introdujo un par de objetos, completamente novedosos para los sujetos y diferentes entre sí. Los roedores tuvieron oportunidad de explorar libremente los objetos (10 min).

En los siguientes protocolos conductuales sólo se emplearon ratones machos ya que se han reportado diferencias de género en la memoria de ubicación de objetos (Frick y Gresack, 2003) así como diferencias en niveles neuroquímicos (Frick y Berger-Sweeney, 2001; Macbeth, Scharfman, Maclusky, Gautreaux y Luine, 2009).

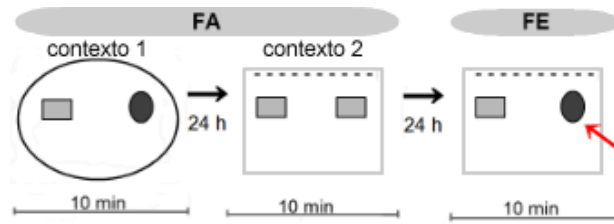
### **Reconocimiento de objetos en contexto**

Un protocolo de la tarea *reconocimiento de objetos en contexto*, basado en el reporte de Balderas y cols. (2008) y esquematizado en la figura 4.1, se aplicó en un grupo de ratones machos (n=8) intactos y de diferentes edades. El protocolo consistió en aplicar cinco días de habituación (10 min) a dos contextos diferentes, con un intervalo de 90 min entre cada uno. En la *fase de adquisición* al *contexto 1* se permitió explorar por 10 min los dos objetos previamente estandarizados y completamente novedosos para cada sujeto (*par 3*); después de un intervalo de 24 h se introdujo a los sujetos al *contexto 2* con un par idéntico de objetos. La *fase de evocación* se realizó después de un intervalo de 24 h, se introdujeron una copia de los dos objetos en el contexto 2. La tarea prueba la asociación de cada objeto con un contexto particular, por lo tanto se espera que los sujetos exploren preferentemente el objeto expuesto en el contexto donde no se había presentado, que denominaremos *contexto novedoso*, comparado con el otro objeto previamente asociado al contexto, que denominaremos *contexto familiar*.

### **Memoria de ubicación de objetos**

El protocolo de la tarea *memoria de ubicación de objetos* basado en los reportes de Haettig y cols. (2011) y Stefanko, Barrett, Ly, Reolon y Wood (2009) se aplicó en dos grupos de ratones machos intactos de diferentes edades, el protocolo se esquematiza en la figura 4.2 y se utilizaron los mismos objetos previamente estandarizados (*par 3*). Todos los sujetos experimentaron tres días de habituación (5 min) y después se dividieron en dos grupos, sujetos que

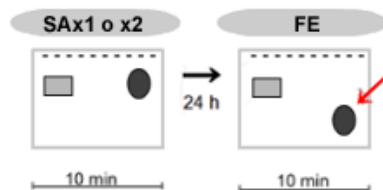




**Figura 4.1** Protocolo esquemático del *reconocimiento de objetos en contexto*.

En la fase de adquisición al contexto 1 se introducen dos objetos diferentes (*par 3*), en la adquisición al contexto 2 se introduce un par de copias de uno de los objetos y en la fase de evocación se introducen en el contexto 2 una copia de cada objeto. La flecha diagonal señala el objeto familiar presente en el contexto novedoso, las flechas horizontales señalan el intervalo entre cada sesión y las líneas punteadas la clave espacial. Fase de adquisición (FA); fase de evocación (FE).

experimentan una (SAx1, n=10) y dos (SAx2, n=8) sesiones de adquisición. En la fase de adquisición se permitió la exploración durante 10 min de los dos objetos diferentes entre si y completamente novedosos para cada sujeto. En el protocolo con dos sesiones de adquisición, la segunda sesión se realizó con un intervalo de 24 h. En fase de evocación se colocó uno de los objetos en una nueva ubicación y el otro objeto en la misma ubicación antes experimentada, ubicación familiar. Los sujetos deben mostrar preferencia por explorar el objeto presente en la nueva ubicación.



**Figura 4.2** Procedimiento esquemático de la *memoria de ubicación de objetos*.

En la fase de adquisición se introducen dos objetos novedosos y diferentes entre si (*par 3*). En la fase de evocación se introduce una copia de cada objeto colocando uno de ellos en una nueva ubicación. La flecha diagonal señala el objeto en la nueva ubicación, las flechas horizontales señalan el intervalo entre fases y las líneas punteadas la clave espacial. Una sesión de adquisición (SAx1); dos sesiones de adquisición (SAx2); fase de evocación (FE). Modificado de Murai y cols. (2007).

Es preciso puntualizar que en el grupo de ratones con cánulas para microdiálisis, se aplicó el mismo protocolo antes descrito de la tarea *memoria de ubicación de objetos* con dos (SAx2) sesiones de adquisición, a diferencia de que previo a la habituación, los sujetos se manipularon de forma individual por el experimentador (1-2 min x tres días) y fueron habituados con un collar de plástico especial

para ratón (el cual se asegura al mecanismo de balanceo, ver fig. 4.4b).

### 4.3 Análisis conductual

Todas las sesiones de los protocolos conductuales probados fueron videograbadas con cámaras digitales para su posterior análisis. Dos observadores fueron entrenados para cronometrar la duración de la conducta de exploración (en intervalos de 1 min) para cada objeto, durante los 10 min en que transcurre cada sesión.

Una *exploración* consiste en que los sujetos orientan su cabeza hacia los objetos a una distancia menor a 2 cm; no se consideran exploraciones cuando los ratones no orientan la cabeza hacia los objetos o caminan alrededor, ni cuando los utilizan de apoyo o muerden (Dix y Aggleton, 1999; Ennaceur y Meliani, 1992; Wimmer, Hernandez, Blackwell y Abel, 2011). En todos los análisis, los dos observadores desconocieron la fase de la tarea, la asociación de los objetos con el contexto o la ubicación familiar/novedosa de los estímulos.

#### Confiabilidad interobservador

Para obtener indicadores de confiabilidad interobservadores, los observadores calificaron de forma independiente los mismos vídeos de un protocolo de la *memoria de ubicación de objetos*; así, se obtuvieron valores pareados min por min, para cada objeto durante cada sesión. Para cada valor pareado se obtuvo un porcentaje de correspondencia, es decir, en cada par de valores se dividió el valor indicado por el observador 1 entre el indicado por el observador 2. Cada correspondencia se promedió por objeto durante cada sesión y se obtuvo un promedio total (n=180). En el apéndice, tabla fig. 7.1, se indican los altos porcentajes de correspondencia obtenidos para cada objeto y un porcentaje de correspondencia total de 76.6% con un error estándar de  $\pm 2.3$ . Adicionalmente, los valores pareados min por min se sometieron a un análisis por una correlación de Pearson para cada objeto y durante cada sesión. En el apéndice, tabla fig. 7.2, se indican los altos coeficientes de correlación obtenidos para los objetos y un coeficiente de correlación total de  $r = 0.863$ , indicando una correlación positiva entre las mediciones de ambos observadores. Por ambos

análisis se puede concluir que los valores que registraron los observadores son confiables para evaluar la duración de la conducta de exploración. Así, en el resto de los protocolos probados la conducta de exploración fue analizada por alguno de los dos observadores.

### **Índice de reconocimiento**

A partir de los registros de las exploraciones en cada protocolo probado, se obtuvieron índices de reconocimiento. En el caso de las estandarizaciones de los objetos se calculó un *índice de exploración* (IE) para cada objeto, calculado por el tiempo de exploración del objeto 1 (O1) entre el tiempo total de exploración del objeto 2 más el objeto 1 (O2+O1) (ver ecuación 4.1), así como el tiempo de exploración del objeto 2 entre el tiempo total de exploración del objeto 2 más el objeto 1.

$$IE = \frac{O1}{(O2 + O1)} \quad ; \quad = \frac{O2}{(O2 + O1)} \quad (4.1)$$

Para el *reconocimiento de objetos en contexto* se aplica el mismo método, calculando un *índice de reconocimiento del contexto* (IRC) que considera el tiempo de exploración del objeto en el contexto novedoso (CN) entre el tiempo total de exploración del objeto en el contexto novedoso más el objeto en el contexto familiar (CN+CF) (ver ecuación 4.2). De igual forma se obtuvo el IRC del objeto en el contexto familiar al dividir su tiempo de exploración entre el tiempo total de exploración de ambos objetos.

$$IRC = \frac{CN}{(CF + CN)} \quad ; \quad = \frac{CF}{(CF + CN)} \quad (4.2)$$

En la *memoria de ubicación objetos* obtenemos un *índice de reconocimiento de la ubicación* (IRU), considerando el tiempo empleado en explorar el objeto en la nueva ubicación (NU) en proporción al tiempo total de exploración del objeto en la ubicación familiar más el objeto en la nueva ubicación (UF+NU) (ver

ecuación 4.3), así como el IRU para el objeto en objeto en la ubicación familiar.

$$IRU = \frac{NU}{(UF + NU)} ; = \frac{UF}{(UF + NU)} \quad (4.3)$$

Cuando los IE, IRC o los IRU se encuentran alrededor de 0.5 indica que no hay preferencias por alguno de los objetos. Un índice mayor a 0.5 indica preferencia por explorar algún objeto. Se utilizó el programa OpenOffice.org Calc 3.4.1 para realizar los cálculos.

## 4.4 Análisis neuroquímico

El análisis neuroquímico comprende dos procedimientos, la obtención de muestras por microdiálisis en libre movimiento<sup>1</sup> y la detección de los neurotransmisores por la técnica de electroforesis capilar.

### 4.4.1 Microdiálisis en libre movimiento

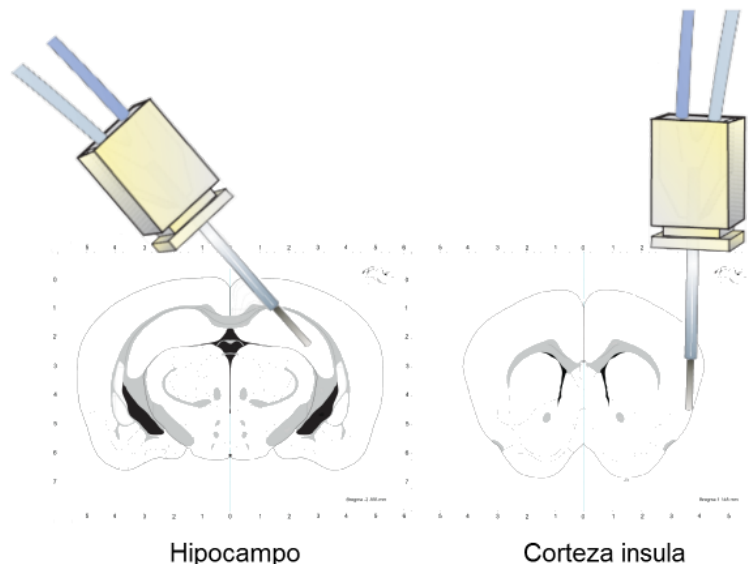
#### Cirugía

Se utilizaron cánulas guía CMA/7 (CMA/Microdialysis Probe, Suecia) fabricadas de poliuretano biocompatible (largo 10 mm y diametro en la punta 0.5 mm; ver fig. 4.4a). Las cánulas se implantaron el HIP y en la CI de forma unilateral en los hemisferios izquierdos de un grupo de ratones WT machos de 5 meses de edad. Los sujetos fueron anestesiados vía intraperitoneal con una dilución 1:1 de pentobarbital sódico (Salud y Bienestar Animal, México) y solución salina 0.9% a una dosis de 1.25 mL/kg; o bien, con anestesia por inhalación de isoflurano líquido (Pisa, México) liberado con oxígeno (inducción al 5% y mantenimiento entre 0.5 a 1%).

Los sujetos se aseguraron en un aparato estereotáxico (Stoelting 620, E.U.A.) equipado con adaptador de ratón. Los puntos bregma y lambda fueron alineados en el mismo plano horizontal. Las cánulas se implantaron según las coordenadas

<sup>1</sup>La técnica de microdiálisis se realiza en animales en libre movimiento mientras se obtienen muestras de sustancias endógenas presentes en el espacio extracelular con un mínimo daño en el tejido nervioso.

para el HIP inclinación de 40° respecto al eje vertical, -1.0 mm dorsoventral, 0.5 mm mediolateral y -2.35 mm antero posterior (respecto a bregma); para la CI dorsoventral -2.75 mm, mediolateral +3.3 mm y antero posterior +1.1 mm (respecto a bregma) (fig. 4.3) (Hong-Wei y Allen Institute of Brain Science, 2008).



**Figura 4.3** Ubicación de cánulas guía según las coordenadas para el HIP y la CI sobre atlas estereotáxico del cerebro de ratón en un plano coronal. Modificado de Hong-Wei y Allen Institute of Brain Science (2008).

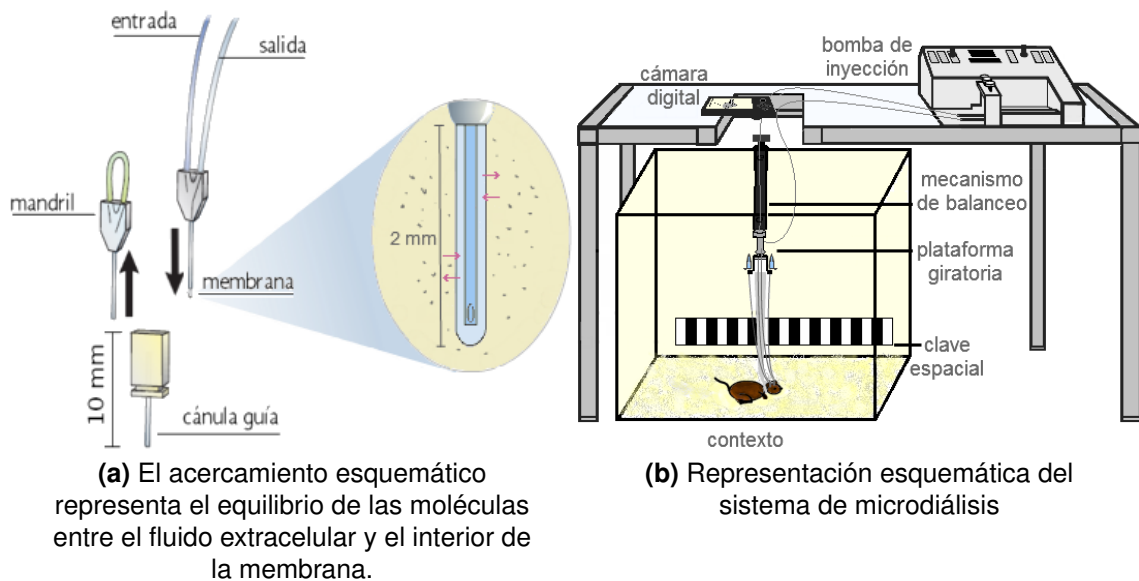
Las cánulas se fijaron con acrílico dental y se colocaron dos tornillos para un mejor soporte. Se aplicaron antibiótico tópicos y se dispusieron cuatro días de recuperación.

Se emplearon sondas de microdiálisis CMA/7 de 2 mm (CMA/Microdialysis Probe, Suecia) formadas por dos tuberías concéntricas, una de entrada, para la perfusión de fluido cerebroespinal artificial (FCEA) [ $NaCl$  118mM,  $KCl$  4.7mM,  $KH_2PO_4$  1.2mM,  $MgSO_4$  1.2mM,  $CaCl_2$  2.5mM,  $NaHCO_3$  19mM y  $Glucosa$  3.3mM; pH 7.4], y otra de salida, para la recolección de las muestras microdializadas. En la punta de la sonda se ubica la membrana semipermeable (diámetro 0.24 mm, porosidad 6000 Da; ver fig. 4.4a), donde por difusión<sup>2</sup> y gradiente de concentración<sup>3</sup> las moléculas se equilibran permitiendo la recolección de una porción representativa de todos aquellos compuestos, incluidos los

<sup>2</sup>Difusión: Movimiento molecular en ambos sentidos.

<sup>3</sup>Gradiente de concentración: La diferencia de concentración entre el fluido cerebroespinal perfundido y el fluido extracelular gobierna la dirección del gradiente.

neurotransmisores, presentes en el espacio sináptico.



**Figura 4.4** Sonda y sistema de microdiálisis en el contexto de la prueba.

Se perfundió FCEA a través de jeringas para microdiálisis de 1 mL montadas en bombas de inyección (100 pump CMA Microdialysis, Suecia) pasando por tuberías unidas a una plataforma giratoria, conectada directamente a la tubería de entrada de la sonda (ver fig. 4.4b). Las sondas se insertaron en el HIP y en la CI a través de las cánulas guía y a partir de este momento los sujetos permanecieron de forma individual dentro del contexto. El flujo de perfusión se inició en  $1.0 \mu\text{L}/\text{min}$  hasta asegurar la salida del fluido y posteriormente se dispuso de un periodo de estabilización (1 h) con un flujo de  $0.25 \mu\text{L}/\text{min}$ , mismo que se mantuvo durante recolección de muestras y hasta finalizar la técnica.

Cada muestra se recibió en viales con  $1 \mu\text{L}$  de mezcla antioxidante [ácido ascórbico  $0.25\text{mM}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   $0.27\text{mM}$  y ácido acético  $0.1\text{M}$ ] y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis. Se recuperaron seis fracciones (F1-6) de muestras recolectada en un tiempo de 16 min con un volumen calculado entre 4 a  $5 \mu\text{L}$ . Entre la F3 y F4 se recuperó una muestra denominada tiempo muerto (TM) equivalente a 15 min 16 s correspondiente a la demora de tiempo en que la F4 coincide con el inicio de la prueba, el cálculo considera la longitud total de la sonda, su volumen interno y el flujo de perfusión del fluido (ver cálculo en apéndice, ecuación 7.1).

## Análisis histológico

Al terminar los experimentos se analizó la correcta ubicación de las cánulas guía. Los sujetos microdializados fueron anestesiados intraperitoneal con una dosis letal de pentobarbital (dilución 1:1). Se realizaron perfusiones transcárdiales con solución salina 0.9%, seguida de paraformaldehído 4% misma en la que los cerebros disectados fueron almacenados. Para la etapa de crioprotección se cambió el paraformaldehído por un gradiente de sacarosa (15% y 30% en amortiguador de fosfatos, 4°C). Se realizaron cortes coronales (30  $\mu\text{m}$ ) recuperando las áreas circundantes a la cánulas guía y se aplicó la tinción Nissl. Para analizar y reportar la ubicación de la membrana se tomaron fotomicrografías de los cortes con cámara digital adaptada a un estereomicroscopio.

### 4.4.2 Detección de los neurotransmisores

La técnica de *electroforesis capilar*<sup>4</sup> con *detección por fluorescencia inducida por láser*<sup>5</sup> (EC-FIL) detecta los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA contenidos en cada muestra microdializada. Cada método empleado en esta técnica fue previamente estandarizado en el laboratorio (Moreno, 2005).

### Derivatización

Se empleó una derivatización química para mejorar la selectividad del láser al detectar catecolaminas y aminoácidos. La derivatización consistió en añadir un fluoróforo FQ [ $\beta$  - (2 - furoil) quinolina - 2 - carboxaldehído, 9.95mM] (Molecular Probes Invitrogen, E.U.A.) a cada muestra, en presencia de oscuridad, cianuro de potasio [24.5mM], amortiguador de boratos [10mM] y calor (baño termostático 65°, 15 min) se desencadena la reacción para formar conjugados con los grupos amino; además se añadió una concentración constante de un compuesto [*O* - metil *L* - treonina, 0.0751mM] para tener referencia de la eficiencia de la reacción.

---

<sup>4</sup>Electroforesis capilar: técnica para separar moléculas en una disolución de acuerdo a la relación masa-carga dentro de un tubo capilar bajo la acción de un campo eléctrico. Consta de la *separación* de los analitos y la *detección* de los mismos (Wehr, Rodríguez-Díaz y Zhu, 1998)

<sup>5</sup>Fluorecencia inducida por láser: emplean detecciones de alta sensibilidad (límite de detección  $10^{-14}$ - $10^{-16}$ ) para pequeñas muestras con una amplia variedad de compuestos biológicos.

## EC-FIL

### *Separación*

Se utilizó el equipo de EC P/ACE MDQ Glycoprotein system (Beckman Coulter, E.U.A) (fig. 4.5). La separación inició una vez que la muestra se inyectó (por presión, 0.5 psi) en el capilar y los extremos del capilar junto con los electrodos fueron inmersos en el amortiguador de corrida [*boratos 35mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) 25mM, β – ciclodextrinas β – CD 5mM, metanol 13 – 17% grado HPLC; pH 9.6*] preparado según la separación de *cromatografía electrocinética micelar*<sup>6</sup>, misma que al aplicar corriente (23kV) mejora la separación tanto de moléculas iónicas similares como de moléculas neutras (ver figura 4.5, acercamiento esquematizado).

### *Detección*

Conforme las moléculas van migrando, pasan por una ventana libre de recubrimiento de sílice en donde el láser detecta a los analitos derivatizados. Después de cada corrida se realizó un método de limpieza del capilar [*NaOH 0.1M, agua, amortiguador de corrida*]. El fluoróforo absorbió los fotones emitidos por el láser, que al excitarse son promovidos a un nivel energético superior para después regresar a su estado energético basal, emitiendo así una señal de fluorescencia. La señal fue detectada y transducida en una señal electrónica, registrada mediante el programa 32 Karat™. La detección de los analitos presentes en cada muestra se expresó en electroferogramas, representación gráfica de cada analito detectado por el láser en tiempo. Los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA se identificaron al emparejar patrones de alta concentración para cada neurotransmisor y el programa calculó el área bajo la curva (integrales).

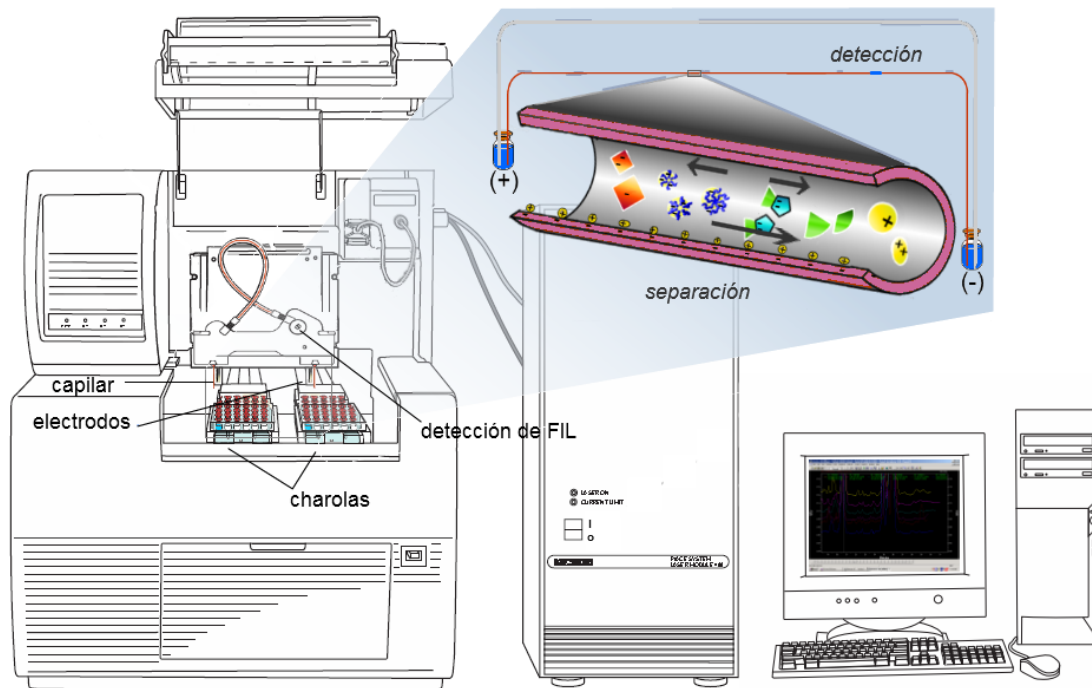
## **Cuantificación de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA**

Las integrales obtenida para cada neurotransmisor se corrigieron con el volumen obtenido en cada muestra y la integral del compuesto de referencia. La con-

---

<sup>6</sup>Cromatografía electrocinética micelar: tipo de separación en el que la velocidad de migración se realiza en función de su carga eléctrica neta; por dos fenómenos, la *movilidad electroforética* y el *flujo electroosmótico*, el primero ocurre por la atracción de los compuestos iónicos (aniones y cationes) hacia ambas direcciones del capilar, el segundo se produce por la formación de una capa fija producida por la carga negativa de la pared interna del capilar, los cationes alejados de la pared forman capas móviles en una sola dirección, arrastrando a compuestos neutros como aquellos con carga negativa.





**Figura 4.5** Equipo de electroforesis capilar equipado con un láser de argón (longitud de excitación  $\lambda_{ex}$  488 nm), fuente de alto voltaje, detector de FIL, capilar recubierto de sílice (diámetro  $75 \mu\text{m}$  y 50 cm de largo), charolas para muestras y amortiguadores, dos electrodos de platino y una computadora para el control automatizado y el análisis de resultados.

centración de neurotransmisor contenido en cada muestra se calculó con una cuantificación obtenida por curvas de calibración para los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA. La concentración de los neurotransmisores se rectificó con el promedio de las líneas basales ( $F1$ ,  $F2$  y  $F3$ ) y los resultados se presentaron en porcentaje. Todos los datos se calcularon con el programa OpenOffice.org Calc 3.4.1.

## 4.5 Análisis estadístico

En la estandarización de los objetos se aplicaron pruebas t para muestras relacionadas con una diferencia hipotética de 0 entre los IE de cada objeto. Se excluyeron a dos sujetos por no explorar alguno de los objetos, es decir con algún IE igual a 0 o 1, ya que se asume que la discriminación se basa en comparar ambos estímulos (Gaskin y cols., 2011; Mumby y cols., 2002).

En las fases de adquisición de los protocolos *reconocimiento de objetos en*

*contextos y memoria de ubicación de objetos* se aplicaron pruebas t para un grupo con media hipotética igual a 0.5. En las fases de evocación de los protocolos *reconocimiento de objetos en contextos y memoria de ubicación de objetos* se aplicaron pruebas t para un grupo con media hipotética mayor a 0.5 para el IRC del objeto en el contexto novedoso y para el IRU del objeto en la nueva ubicación. Los IE, IRC o IRU se presentan en gráficas de barras representando cada objeto en las diferentes sesiones.

Para la tarea *memoria de ubicación de objetos* pareada con microdiálisis se midió el tiempo total de exploración para cada objeto en las tres sesiones de la tarea y se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para observar variaciones entre cada sesión, los resultados se presentan en una gráfica lineal.

Para determinar que los cambios en la liberación de los neurotransmisores correspondan al momento en que se induce la memoria de reconocimiento se aplicaron ANOVAs de un factor con seis niveles de medidas repetidas, antes (F1, F2, F3), durante (F4) y después (F5 y F6) de ejecutar la fase de evocación de la *memoria de ubicación de objetos*; y análisis post-hoc para múltiples comparaciones con la prueba Fisher PLSD. Los resultados se presentan en gráficas lineales y se expresan en porcentaje de liberación basal para cada neurotransmisor recuperado en el HIP o en la CI.

En el programa StatView versión 4.57 para Windows se calcularon todas las pruebas estadísticas. En todos los resultados se consideró que una  $P \leq 0.05$  es significativa. Todos los resultados se presentan en promedio  $\pm$  error estándar.



## 5 Resultados

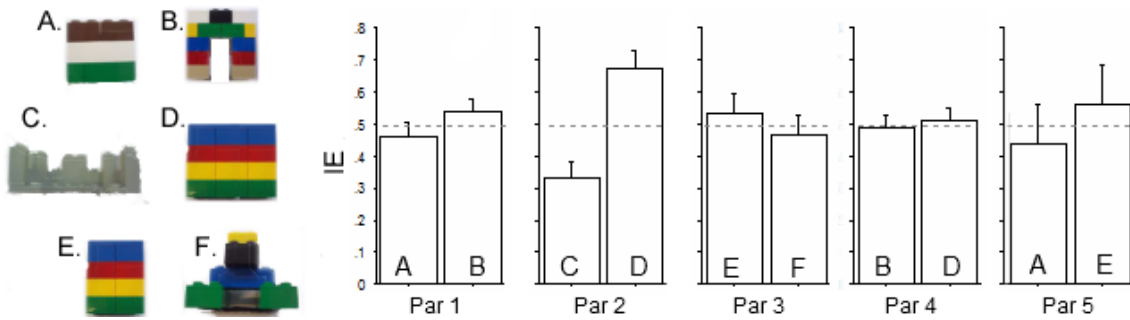
En la primera etapa metodológica probamos diferentes paradigmas conductuales -*reconocimiento de objetos en contexto y memoria de ubicación de objetos*- a fin de identificar entre ellos aquel protocolo que permita un registro confiable del componente contextual de la memoria de reconocimiento. A partir del protocolo estandarizado y con validez en los resultados, entonces realizamos la segunda etapa metodológica, estableciendo un muestreo del fluido cerebroespinal en el HIP y en la CI, así como el análisis de los niveles extracelulares de los neurotransmisores a fin de identificar cambios en la neurotransmisión en distintas condiciones: antes, durante y posterior a la ejecución exitosa de la fase de evocación. A continuación se describen los resultados para ambas etapas.

### 5.1 Evaluación y estandarización de protocolos conductuales

#### Estandarización de pares de objetos

Durante la libre exploración (10 min) de cinco diferentes combinaciones de pares de objetos, cuatro de los cinco grupos de ratones hembras de diferentes edades ( $n=4$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los IE de los pares de objetos combinados [ $par1 t_{(3)} = -0.918, P = 0.426$ ;  $par3 t_{(3)} = 0.574, P = 0.606$ ;  $par4 t_{(3)} = 0.286, P = 0.793$ ;  $par5 t_{(3)} = 0.499, P = 0.651$ ], mientras que un grupo mostró exploraciones que caen en el límite de la significancia estadística [ $par2 t_{(3)} = -3.058, P = 0.055$ ]. Los resultados se representan en la fig. 5.1 y se resumen en el apéndice, tabla 7.3.

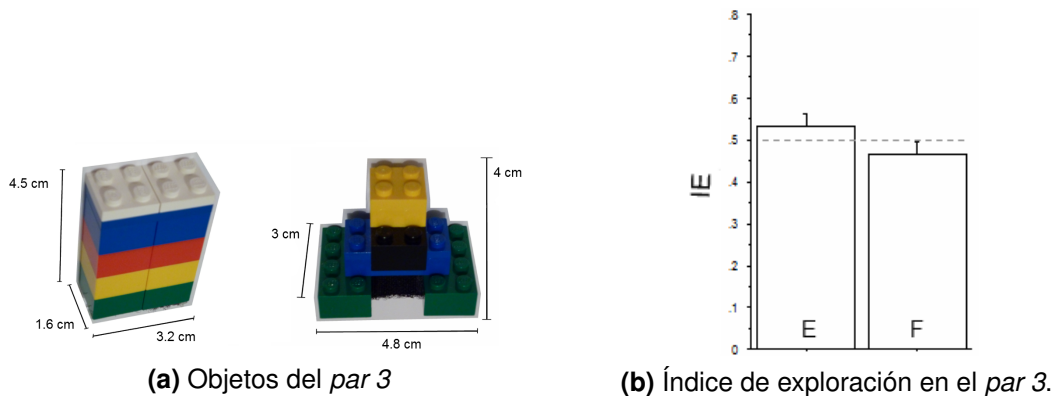
Dado que el *par 3* de objetos (fig. 5.2a) obtuvo una de las mínimas diferencias entre los IE se eligió para estandarizar en un grupo de ratones machos intactos de diferentes edades ( $n=23$ ). Los sujetos no mostraron preferencia estadísticamente significativa entre los IE de los objetos E y F [ $par3 t_{(22)} = 1.210, P = 0.239$ ]. La figura 5.2b muestra los resultados de la estandarización del *par 3*



**Figura 5.1** Estandarización de cinco pares de objetos.

Objetos empleados en la estandarización y gráficas que indican el índice de exploración (IE) de cinco diferentes combinaciones de pares de objetos. Cuatro grupos de ratones hembras ( $n=4$ ) exploran por igual los objetos del *par 1*, *par 3* y *par 4* y *par 5*, el grupo de ratones que exploró el *par 2* mostró preferencia por explorar uno de los objetos ( $*P=0.055$ ). La línea punteada indica la media hipotética y las letras A, B, C, D, E y F representan los objetos. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  error estándar.

y se resumen en el apéndice, tabla 7.4.



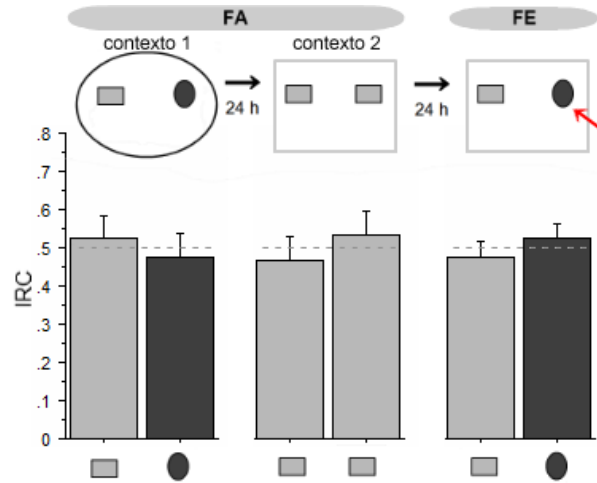
**Figura 5.2** Estandarización de un par de objetos.

Objetos empleados en la estandarización del *par 3* y gráfica que indican los índices de exploración (IE) de los objetos E y F. Los resultados se interpretan en que un grupo de ratones machos ( $n=23$ ) explora equitativamente los objetos E y F ( $P=0.239$ ). La línea punteada indica la media hipotética. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  error estándar.

## Reconocimiento de objetos en contexto

Con el objetivo de evaluar tareas dependientes del componente contextual probamos un protocolo para la tarea *reconocimiento de objetos en contexto* en ratones machos ( $n=8$ ). El análisis estadístico indicó que los sujetos no incrementaron significativamente el IRC para el objeto presente en el contexto novedoso [ $t_{(7)} = -0.599$ ,  $P = 0.716$ ]; es decir, que no reconocieron el cambio

contextual. La figura 5.3 esquematiza el protocolo y los resultados obtenidos. Los resultados se resumen en el apéndice, tabla 7.5.

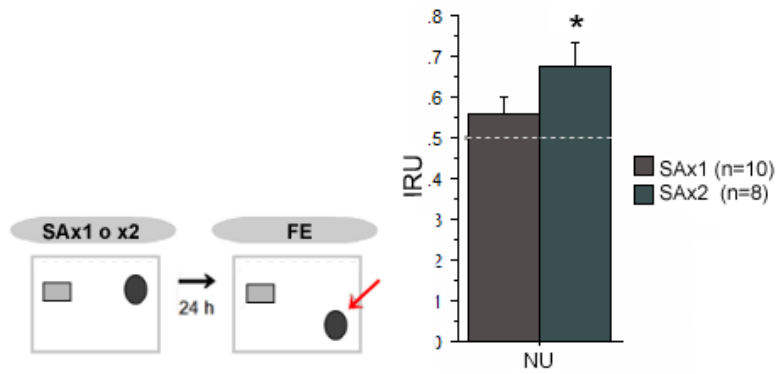


**Figura 5.3** Índices de reconocimiento contextual (IRC) en el *reconocimiento de objetos en contexto* y representación esquemática de la tarea durante las sesiones de adquisición (FA) al contexto 1 y al contexto 2, así como durante la fase de evocación (FE). El grupo de sujetos ( $n=8$ ) no reconoció el cambio contextual ( $P=0.716$ ). Cada barra indica el objeto respectivo en el diagrama superior, las flechas horizontales indican el intervalo entre fases, la flecha diagonal indica el objeto presente en el nuevo contexto, las líneas punteadas indican la media hipotética. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  error estándar.

## Memoria de ubicación de objetos

Aplicamos un protocolo de la *memoria de ubicación de objetos* con los dos objetos previamente estandarizados en dos grupos de ratones machos. Los sujetos experimentaron una o dos sesiones de adquisición (SAx1 o SAx2). El análisis estadístico indicó que el grupo que experimentó una sesión (SAx1,  $n=10$ ) no incrementó significativamente su preferencia hacia el objeto en la nueva ubicación [ $SAx1 t_{(9)} = 1.363, P = 0.206$ ], mientras que los sujetos que experimentaron dos sesiones (SAx2,  $n=8$ ) muestran capacidad de recordar la disposición original de los objetos al explorar por más tiempo aquel colocado en la nueva ubicación [ $SAx2 t_{(7)} = 2.836, P = 0.025$ ]. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.4 y se resumen en el apéndice, tabla 7.6.

Con los resultados antes mencionados, se cumplió el objetivo de evaluar distintos protocolos que evaluaran el componente contextual de la memoria de reconoci-



**Figura 5.4** Índices de reconocimiento de la ubicación (IRU) para el objeto presente en la nueva ubicación (NU) y representación esquemática de la tarea *memoria de ubicación de objetos*. El grupo de ratones que experimentó dos sesiones de adquisición (SAx2 n=8) reconoció la nueva ubicación del objeto en la fase de evocación (FE) (\* $P < .05$  vs media hipotética) mientras que el grupo que experimentó una sesión de adquisición (SAx1, n=10) no reconoció el cambio contextual ( $P = 0.025$ ). La flecha horizontal indican el intervalo entre fases, la flecha diagonal indica el objeto presente en la nueva ubicación, la línea punteada indican la media hipotética. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  error estándar.

miento. Se identificó que la tarea *memoria de ubicación de los objetos* con dos sesiones de adquisición permite un reconocimiento exitoso de la disposición contextual de los objetos en ratones machos intactos de diferentes edades.

## 5.2 Evaluación de la *memoria de ubicación de objetos* pareada con el muestreo de neurotransmisores

Una vez estandarizada la tarea *memoria de ubicación de objetos*, se aplicó en el grupo de sujetos machos de 5 meses de edad canulados para microdiálisis (n=10). Los procedimientos realizados se esquematizan en la figura 5.5.



**Figura 5.5** Cronograma para el grupo de sujetos que ejecutaron la *memoria de ubicación de objetos* pareada con microdiálisis en libre movimiento. Sesión de adquisición 1 (SA1); sesión de adquisición 2 (SA2); fase de evocación (FE); fracciones (F1 a F6).

Observamos que posterior a la cirugía de implantación de cánulas, el grupo de

ratones machos de 5 meses de edad no mostraron alteraciones en la salud. Durante la recuperación de muestras por microdiálisis, los sujetos no mostraron interés o molestia por las cánulas guía, ni por las sondas. Antes y después de inducir la fase de evocación, los sujetos mostraron activos, con conducta de sueño y acicalamiento; sin embargo, uno de los sujetos se mostró en exceso pasivo y su condición fue ajena a la realización de la técnica, por lo que convenimos excluirlo de los análisis posteriores (n=9).

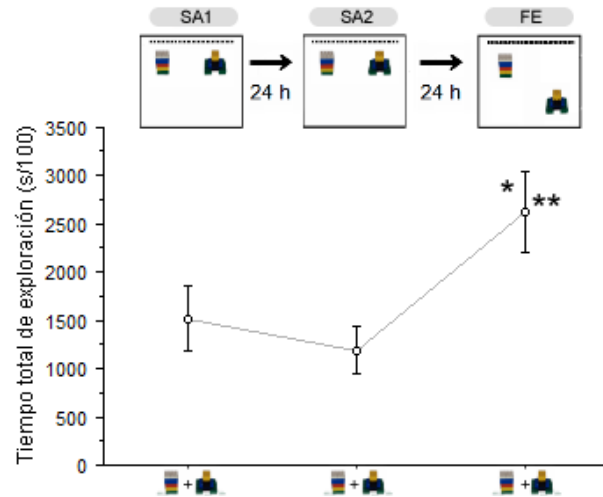
### **Diferencias entre tiempos totales de exploración**

Analizamos los tiempos totales de exploración durante cada sesión de la tarea *memoria de ubicación de objetos*. El análisis estadístico indicó que los sujetos presentaron variaciones significativas [ $F_{(2,16)} = 10.4, P = 0.001$ ], la prueba post-hoc de Fisher (PLSD) reveló que entre las sesiones de adquisición uno y dos, los tiempos totales de exploración no difiere significativamente [ $S1 - S2, P = 0.634$ ], mientras que en la fase de evocación incrementa considerablemente respecto a ambas adquisiciones [ $S1 - FE, P = 0.015; S2 - FE, P = 0.005$ ]. Los resultados se representan en la figura 5.6.

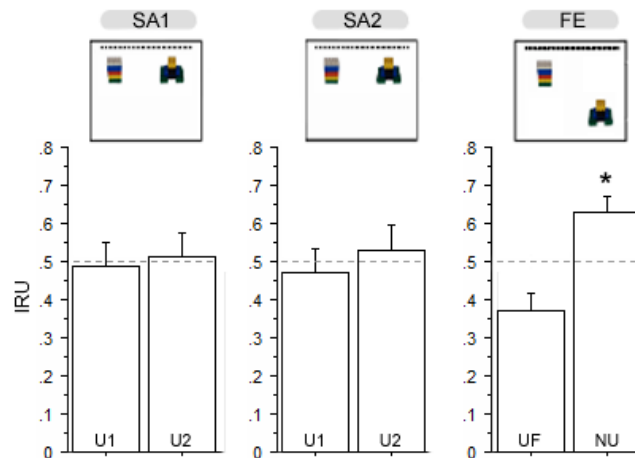
### **Incremento del índice de reconocimiento de la ubicación de los objetos**

Analizar el IRU permite obtener un indicador de la preferencia de los roedores por explorar alguno de los objetos. Cuando el IRU del objeto en la nueva ubicación es mayor a 0.5 indica un exitoso reconocimiento del cambio contextual. El análisis estadístico reveló que los sujetos no mostraron diferencias en explorar la ubicación de los objetos en la sesión de adquisición uno [ $U1 - U2 t_{(8)} = 0.227, P = 0.826$ ], ni en la sesión de adquisición dos [ $U1 - U2 t_{(8)} = 0.494, P = 0.634$ ] comparados con la media hipotética. Durante la fase de evocación encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre los IRU de aquellos objetos en la nueva ubicación respecto a una media hipotética mayor a 0.5 [ $NU t_{(8)} = 2.121, P = 0.03$ ]. Mientras que la exploración del objeto en la ubicación familiar disminuye significativamente [ $UF t_{(8)} = 2.896, P = 0.01$ ]. La figura 5.7 esquematiza los resultados obtenidos y se resumen en el apéndice, tabla 7.7.





**Figura 5.6** Representación esquemática de la tarea *memoria de ubicación de objetos* y tiempos totales de exploración en cada sesión. El grupo de sujetos canulados ( $n=9$ ) mostró activas exploraciones durante la sesión de adquisición 1 (SA1), que disminuye durante la sesión de adquisición 2 (SA2). En la fase de evocación (FE) los sujetos mostraron un incremento significativo de las exploraciones ( $*P < 0.05$  FE vs SA1,  $**P < 0.01$  FE vs SA2). Las flechas horizontales indican el intervalo entre fases. Los datos se presentan en promedio  $\pm$  error estándar.



**Figura 5.7** Representación esquemática de la tarea *memoria de ubicación de objetos* e índices del reconocimiento de la ubicación (IRU). El grupo de sujetos canulados ( $n=9$ ) reconoció significativamente la nueva ubicación ( $*P < 0.05$  vs media hipotética). Cada barra indica el objeto respectivo del diagrama superior, las líneas punteadas indican la media hipotética. Sesión de adquisición 1 (SA1); sesión de adquisición 2 (SA2) y fase de evocación (FE); ubicación 1 (U1); ubicación 2 (U2); nueva ubicación (NU); ubicación familiar (UF). Los datos se presentan en promedio  $\pm$  error estándar.

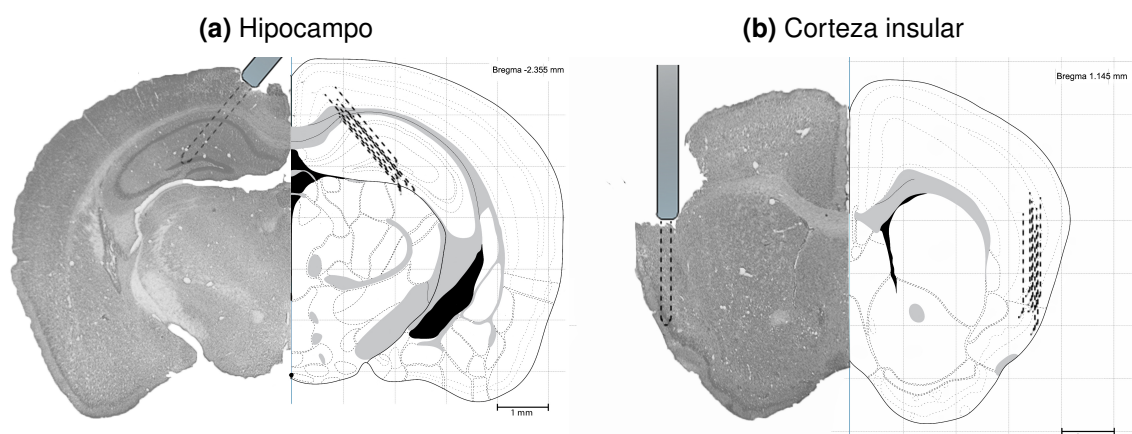
## Recuperación de fluido cerebroespinal

Las muestras obtenidas en el HIP y en la CI del grupo de sujetos ( $n=9$ ) se recuperaron en 6 fracciones de tiempo (16 min); las fracciones F1, F2 y F3 se obtuvieron

antes de la ejecución de la fase de evocación de la tarea *memoria de ubicación de objetos* y por tanto se consideran líneas basales; la F4 se obtuvo durante la fase de evocación de la tarea y posterior a ésta, se recuperaron las muestras F5 y F6 (ver figura 5.5). Por lo tanto, a lo largo de la microdiálisis en libre movimiento recolectamos un total de 54 muestras en el HIP y 54 muestras en la CI. Las muestras se procesaron de acuerdo a la metodología descrita en Guzmán-Ramos, Osorio-Gómez, Moreno-Castilla y Bermúdez-Rattoni (2010), todas las muestras recibieron el mismo tratamiento y una vez recolectadas se mantuvieron en congelación por un periodo máximo de un mes.

### Análisis histológico

Al finalizar la prueba conductual realizamos un análisis histológico en cortes coronales recuperando las áreas circundantes al HIP y a la CI con el fin de verificar la correcta ubicación de las membranas de microdiálisis. En las figuras 5.8a y 5.8b se observan fotomicrografías (hemisferios derechos) del área circundante a la cánula en el HIP y la CI, respectivamente. En dichas figuras se representan las ubicaciones de las membranas de microdiálisis (hemisferios izquierdos-líneas punteadas) para cada sujetos. Este último análisis nos indicó que la ubicación de las membranas en el HIP ( $n=9$ ) y en la CI ( $n=9$ ) fue correcta. El análisis histológico para cada sujeto se encuentra en el apéndice, figuras 7.1 y 7.2).



**Figura 5.8** Micrografía representativa de los análisis histológicos en el HIP y la CI. Hemisferios izquierdos - ejemplos de fotomicrografías y representación de una membrana de microdiálisis según las coordenadas para HIP y CI; Hemisferios derechos - ubicación representativa de las membranas ( $n=9$ ) señaladas con líneas punteadas sobre imagen tomada de atlas estereotáxico (Hong-Wei y Allen Institute of Brain Science, 2008).

El análisis histológico reveló que todas las muestras recuperadas en el HIP y en la CI pueden incluirse en el análisis de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA.

### **5.3 Análisis de los neurotransmisores durante la fase de evocación**

Con el fin de analizar el efecto de inducir una evocación contextual sobre la neurotransmisión en el HIP y en la CI, examinamos mediante el método de EC-FIL, la concentración de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA presentes en las muestras recuperadas antes, durante y después de realizar la fase de evocación de la tarea *memoria de ubicación de objetos* en el grupo de ratones de 5 meses de edad con cánulas (n=9).

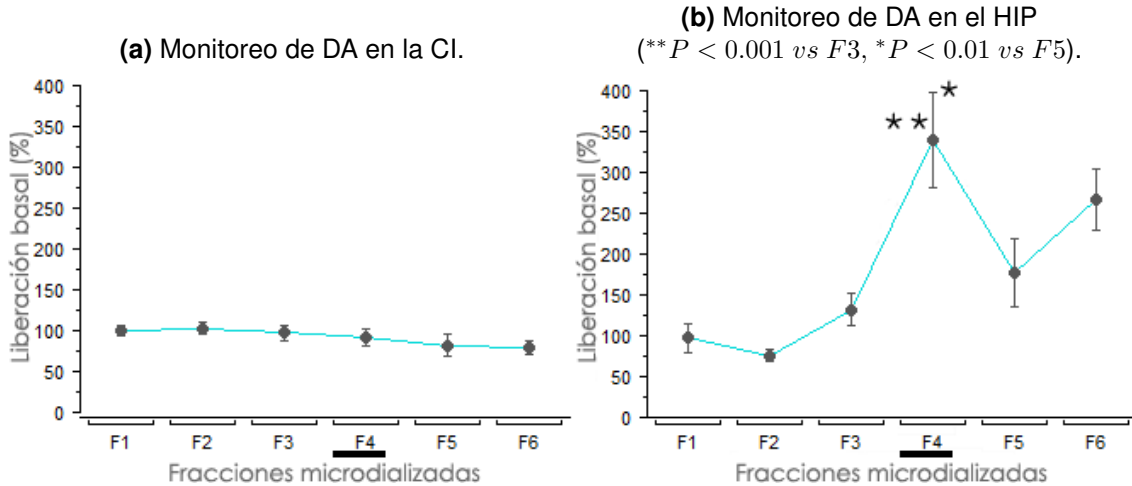
Procesamos las 108 muestras obtenidas de ambas estructuras; sin embargo, en algunas muestras la eficiencia de la recuperación, o bien, la detección de los analitos por EC-FIL no fueron óptimas. De tal forma que conservamos un total de 324 datos para los cuatro neurotransmisores de interés.

#### **Monitoreo de la neurotransmisión de DA y NE**

El análisis estadístico realizado para el neurotransmisor DA reveló que se encontraron diferencias significativas en su concentración extracelular en el HIP [ $F_{(5,20)} = 8.965$ ,  $P = 0.0001$ ]; en tanto, en la CI no se presentaron cambios significativos [ $F_{(5,5)} = 1.371$ ,  $P = 0.368$ ]. Un análisis post-hoc con la prueba Fisher PLSD reveló que la concentración extracelular de DA en el HIP incrementa significativamente durante la fracción correspondiente a la fase de evocación, con respecto a la última línea basal [ $F3 - F4$ ,  $P = 0.0002$ ] y a la fracción posterior [ $F4 - F5$ ,  $P = 0.002$ ].

Por lo tanto, el incremento de DA registrado en el HIP se relacionó con la ejecución de la fase evocación de la *memoria de ubicación de objetos*; es decir, cuando los sujetos reconocieron que un objeto previamente experimentado había cambiado de ubicación. Los resultados obtenidos durante el

monitoreo de la DA se grafican en las figuras 5.9a y 5.9b. El análisis de la prueba Fisher PLSD con resultados significativos se resume en el apéndice, tabla 7.8.

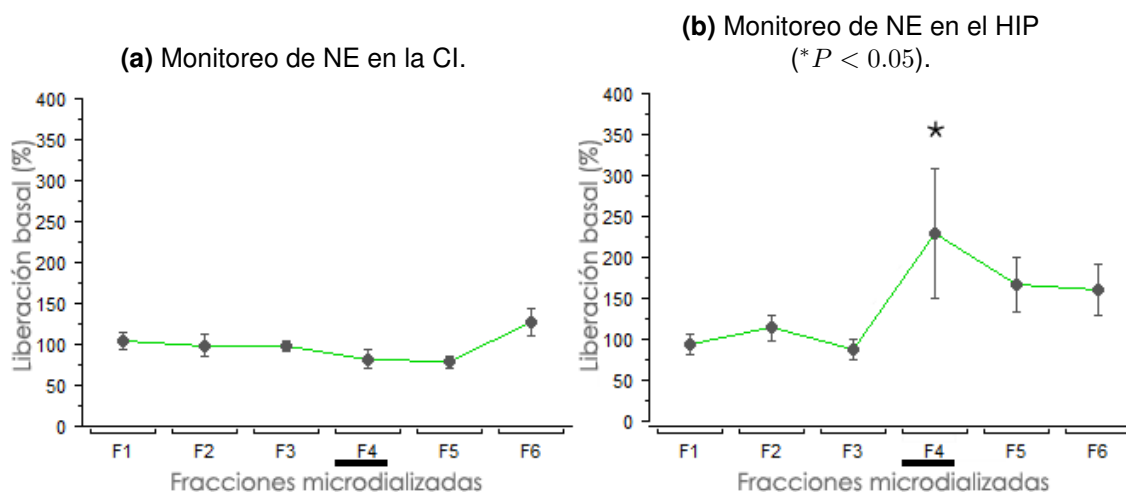


**Figura 5.9** Niveles extracelulares de DA en la CI y el HIP.

Las gráficas describen los porcentajes de liberación de DA registrada en las muestras microdializadas a lo largo de seis fracciones de tiempo. Cuando el grupo de ratones machos de 5 meses de edad ejecuta la evocación dependiente del componente contextual se registró un incremento significativo en la liberación de DA en el HIP (F4,  $n=6$ ); mientras que en la CI no se observaron cambios (F4,  $n=7$ ). La barra negra representa el tiempo en que se ejecuta la fase de evocación. Líneas basales (F1, F2 y F3); fracción pareada con la ejecución conductual de la memoria (F4); fracciones posteriores (F5 y F6).

El análisis estadístico realizado para el neurotransmisor NE reveló que entre la F1 a la F6 no hay diferencias estadísticamente significativas en la concentración extracelular de NE en el HIP [ $F_{(5,30)} = 2.007$   $P = 0.106$ ], al igual que en las muestras obtenidas en la CI [ $F_{(5,10)} = 1.489$   $P = 0.276$ ]. Sin embargo, un análisis post-hoc con la prueba Fisher PLSD reveló que la concentración extracelular de NE en el HIP incrementa significativamente durante la fracción correspondiente a la fase de evocación con respecto a la última línea basal [ $F3-F4$ ,  $P = 0.012$ ].

Es decir, que el incremento de NE registrado en el HIP se relacionó con la ejecución de la fase evocación en la cual los sujetos reconocieron el cambio de ubicación de un objeto. Los resultados obtenidos durante el monitoreo de la NE se grafican en las figuras 5.10a y 5.10b. El análisis de la prueba Fisher PLSD con resultados significativos se resume en el apéndice, tabla 7.9.



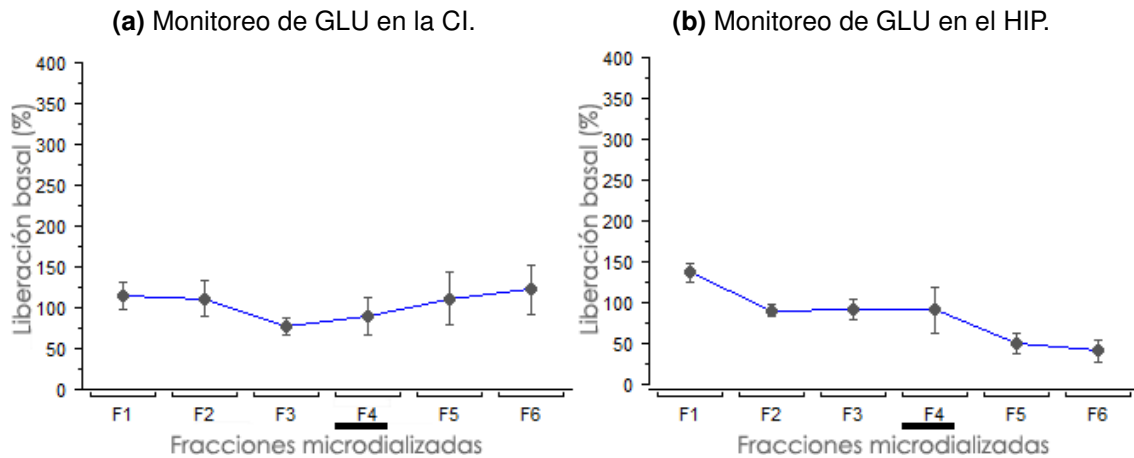
**Figura 5.10** Niveles extracelulares de NE en la CI y el HIP.

Las gráficas describen los porcentajes de la liberación de NE registrada en las muestras microdializadas a lo largo de seis fracciones de tiempo. Los resultados se interpretan en que el grupo de ratones ejecutaron exitosamente la evocación dependiente del componente contextual al tiempo en que se registra un incremento significativo en la liberación de NE en el HIP (F4,  $n=8$ ); mientras que en la CI no se observan cambios (F4,  $n=7$ ). La barra negra representa el tiempo en que se ejecuta la fase de evocación. Líneas basales (F1, F2 y F3); fracción pareada con la ejecución conductual de la memoria (F4); fracciones posteriores (F5 y F6).

## Monitoreo de la neurotransmisión de GLU y GABA

El análisis estadístico realizado para el neurotransmisor GLU reveló que entre las fracciones F1 a F6 hay diferencias significativas en la concentración extracelular de GLU recuperado en el HIP [ $F_{(5,30)} = 5.802$   $p = 0.0007$ ], pero no en la CI [ $F_{(5,10)} = 1.725$   $P = 0.216$ ]. La prueba post-hoc de Fisher PLSD indicó diferencias significativas entre la primer medición basal en el HIP comparado con el resto de las fracciones, así como diferencias significativas entre las líneas basales y las últimas fracciones [ $F2 - F6$ ,  $P = 0.023$ ;  $F3 - F6$ ,  $P = 0.023$ ], además diferencias significativas entre la fracción comprometida con la ejecución de la fase evocación y la última fracción recolectada [ $F4 - F6$ ,  $P = 0.027$ ]. A pesar de encontrar estas diferencias, GLU en el HIP no sufrió modificaciones significativas respecto a la línea basal previa [ $F3 - F4$ ,  $P = 0.948$ ], ni respecto a la siguiente fracción [ $F4 - F5$ ,  $P = 0.064$ ], es decir, entre la fracción previa y posterior a reconocimiento de cambio contextual.

Los resultados obtenidos durante el monitoreo de GLU se grafican en las figuras 5.11a y 5.11b. El análisis de la prueba Fisher PLSD con resultados significativos se resume en el apéndice, tabla 7.10.

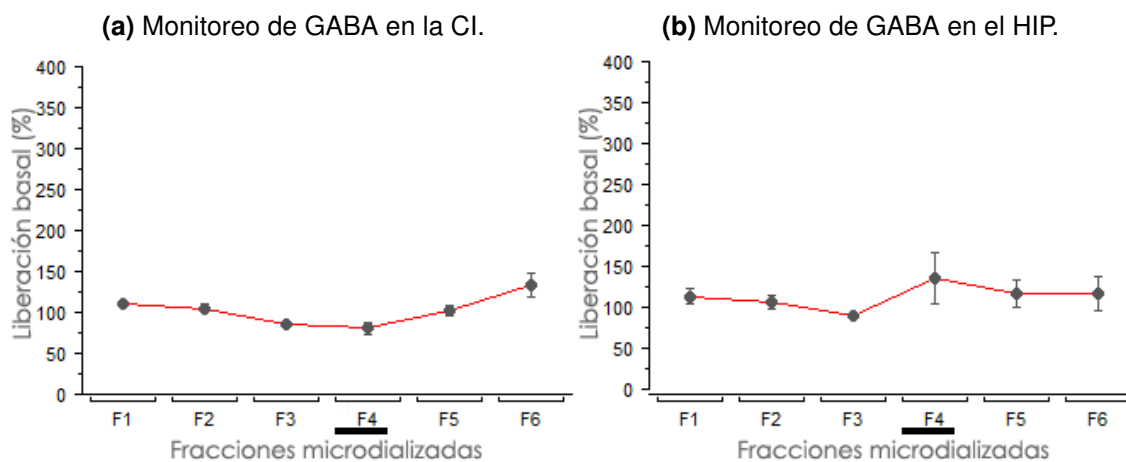


**Figura 5.11** Niveles extracelulares de GLU en la CI y el HIP.

Las gráficas describen los porcentajes de liberación de GLU registrado en las muestras microdializadas a lo largo de seis fracciones de tiempo. Los resultados se interpretan en que el grupo de ratones ejecutó exitosamente una evocación dependiente del componente contextual sin registrar cambios significativos en la liberación de GLU durante la tarea tanto en el HIP (F4, n=7) como en la CI (F4, n=7), pero sí se encontraron diferencias significativas entre las líneas basales y las últimas fracciones. La barra negra representa el tiempo en que se ejecuta la fase de evocación. Líneas basales (F1, F2 y F3); fracción pareada con la ejecución conductual de la memoria (F4); fracciones posteriores (F5 y F6).

El análisis estadístico realizado para el neurotransmisor GABA no reveló diferencias significativas en la concentración extracelular de GABA entre las fracciones recuperadas en el HIP [ $F_{(5,30)} = 0.924$   $P = 0.479$ ] o en la CI [ $F_{(5,10)} = 2.269$   $P = 0.126$ ].

Por lo tanto, durante la ejecución de la fase evocación de la *memoria de ubicación de objetos* en la cual los sujetos reconocieron el cambio de ubicación de un objeto, la liberación de GABA en el HIP y en la CI no sufrió alteraciones. Los resultados obtenidos durante el monitoreo de GABA se grafican en las figuras 5.12a y 5.12b.



**Figura 5.12** Niveles extracelulares de GABA en la CI y el HIP.

Las gráficas describen los porcentajes de la liberación de GABA registrada en las muestras microdializadas a lo largo de seis fracciones de tiempo. No se encontraron cambios significativos en la liberación de GABA en el HIP, ni en la CI. Los resultados se interpretan en que el grupo de ratones ejecutaron exitosamente una evocación dependiente del componente contextual al tiempo en que no se registran cambios significativo en la liberación de GABA en el HIP (F4, n=7) o en la CI (F4, n=7). La barra negra representan el tiempo en que se ejecuta la fase de evocación. Líneas basales (F1, F2 y F3); fracción pareada con la ejecución conductual de la memoria (F4); fracciones posteriores (F5 y F6).

## 6 Discusión

A continuación se discuten los resultados relevantes para la primera etapa metodológica, la cual tuvo por objetivo evaluar distintos protocolos e identificar aquel que permita un registro válido y confiable del componente contextual de la memoria de reconocimiento en ratones intactos.

Inicialmente se evaluaron índices de exploración en distintos pares de objetos con el fin de elegir objetos con tiempos de exploración equitativos. Los resultados de las exploraciones al par 3 de objetos indican que las características físicas de un objetos no predominaron sobre el otro (ver figura 5.1 y 5.2b), por lo tanto dichos estímulos son válidos para emplearse en cualquier protocolo que examine conducta de exploración en ratones machos y hembras de la cepa B6129SF/J.

El protocolo probado para la tarea *reconocimiento de objetos en contexto* no resultó útil para estudiar la memoria a largo plazo en ratones machos (ver figura 5.3). El mismo protocolo es capaz de inducir reconocimiento contextual a corto y largo plazo en ratas (Balderas y cols., 2008; Dix y Aggleton, 1999; Mumby y cols., 2002) aunque no encontramos evidencias de su aplicación en ratones; por tal razón, es posible pensar la especie que evaluamos no muestra capacidades de memoria suficientes para ejecutar la tarea *reconocimiento de objetos en contexto*.

En la tarea *memoria de ubicación de objetos* se evaluaron dos condiciones: una y dos sesiones de adquisición. El grupo que experimentó una única sesión de la fase de adquisición no mostró capacidad de reconocimiento contextual; es decir, indujo una pobre retención de la memoria. Dicha condición resultaría en una tarea útil para probar blancos farmacológicos que generen el mejoramiento u optimización de la memoria de reconocimiento. Por otro lado, el grupo que experimentó dos sesiones de adquisición mostró capacidad para recordar la disposición original de los objetos. Así, la tarea *memoria de ubicación de objetos*



se estandarizó en ratones machos de la cepa B6129SF2/J bajo las siguientes condiciones: tres sesiones de habituación (5 min), dos sesiones de adquisición (10 min), una fase de evocación (10 min) e intervalos de 24 h entre sesiones; siendo éste un protocolo válido y confiable para evaluar, a largo plazo, el reconocimiento del componente contextual.

A partir del protocolo estandarizado, realizamos la segunda etapa de procedimientos en la que evaluamos la tarea *memoria de ubicación de objetos* en el grupo de sujetos machos de 5 meses de edad canulados para microdiálisis. Al evaluar su desempeño conductual encontramos diferencias significativas entre los tiempos totales de exploración durante cada sesión de la prueba (ver figura 5.6). Los resultados señalan que en la sesión de adquisición uno, los sujetos exploraron activamente los dos objetos producto de una experiencia con un alto contenido de novedad. Al someterse a la sesión de adquisición dos, la conducta de exploración disminuyó, posiblemente porque al repetir la misma configuración se refuerzan los patrones de información previamente almacenados. Por el contrario, el marcado incremento de exploración en la fase de evocación, incluso significativamente por encima de cuando se experimentaron los estímulos por primera vez, presume la detección de novedad contextual, así como la relevancia que tiene para los sujetos. Estos datos son consistentes con las observaciones de Manns y Eichenbaum (2009) en las que se aprecia un decremento gradual debido a un efecto de repetición, así como un incremento significativo debido a un efecto de relocalización de los estímulos.

Durante las sesiones de adquisición uno y dos, el grupo de sujetos canulado no mostró preferencia por explorar algún objeto; lo que es consistente con las exploraciones equitativas observadas en la estandarización de los dos objetos y en la estandarización de la tarea *memoria de ubicación de objetos*. Durante la fase de evocación se encontró que los sujetos mostraron preferencia por explorar mayor tiempo los objetos en la nueva ubicación y explorar menor tiempo los objetos en la ubicación familiar (ver figura 5.7). Las diferencias no puede explicarse por la existencia de una preferencia *per se* porque en las sesiones de adquisición las exploraciones fueron equitativas. Así, la preferencia observada por el objeto en la nueva ubicación es un indicador conductual posiblemente asociado con la evocación de la representación contextual previamente experimentada. Además, al encontrar resultados similares entre los sujetos canulados para microdiálisis

y los sujetos intactos empleados para la estandarización, sugerimos que los procedimientos empleados para la técnica de microdiálisis y la recuperación de muestras de fluido cerebroespinal no alteraron las conductas habituales, ni la preferencia por alguno de los objetos o la propia conducta de exploración.

El muestreo de fluido cerebroespinal se realizó el día de la fase de evocación y posteriormente se analizaron los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA contenidos en cada muestra. Encontramos que la DA en el HIP incrementó cerca de 3 veces (300 %) respecto al promedio de las líneas basales (ver figura 5.9b), mientras la NE en el HIP incrementó cerca de 2 veces (200 %) durante la fase de evocación de la tarea *memoria de ubicación de dos objetos* (ver figura 5.10b); no encontramos cambios significativos en la liberación de los neurotransmisores DA y NE en la CI. Por su parte, los neurotransmisores GLU y GABA no cambiaron su liberación en el HIP, ni en la CI al tiempo de la fase de evocación. La liberación de los neurotransmisores apoyan nuestra hipótesis en la que sugerimos que una modificación contextual durante la fase de evocación de una tarea de reconocimientos se relacionará con cambios en la neurotransmisión en el HIP pero no en la CI.

## **6.1 Participación funcional de los neurotransmisores en la memoria de reconocimiento**

### **Dopamina y norepinefrina**

Las catecolaminas son neurotransmisores capaces de modular funciones hipocampales como el aprendizaje y la memoria (Gasbarri, Sulli y Packard, 1997; Lisman y Grace, 2005), aún cuando sus inervaciones no predominan en el HIP respecto a la neurotransmisión glutamatérgica o gabaérgica. En el presente trabajo, el incremento de DA en el HIP registrado durante la fase de evocación de la tarea *memoria de ubicación de objetos* es congruente con los antecedentes que destacan su participación al inducir la fase de evocación en otras tareas dependientes del componente contextual evaluadas a corto (Hotte y cols., 2005) y largo plazo (Vago y Kesner, 2008). Con base en estos hallazgos surge la necesidad de discutir las funciones que podría tener la neurotransmisión dopaminérgica en la memoria de reconocimiento. El sistema dopaminérgico puede proveer información acerca de la saliencia de los estímulos en un contexto

aprendido (Ito y Schuman, 2008; McClure, Daw y Read Montague, 2003), como se observa también en los reportes antes referido en los cuales se detecta un incremento de la liberación dopaminérgica en HIP al exponer a roedores ante novedad espacial (Ihalainen y cols., 1999) y de forma similar en la CI al exponer objetos novedosos (Guzmán-Ramos y cols., 2012). Mas aún, Lisman y Grace (2005) postulan que el HIP esta involucrado en la detección de nueva información que no ha sido almacenada a largo plazo, gracias a un circuito funcional entre el HIP y las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental.

Respecto a la participación de la NE, no se han reportado los efectos que se producen al alterar o simplemente medir la comunicación noradrenérgica en el HIP durante tareas que evalúen el componente contextual. Durante la adquisición de objetos novedosos Guzmán-Ramos y cols. (2012) no reportaron cambios en la liberación noradrenérgica en el HIP o en la CI, mientras que Ihalainen y cols. (1999) si reportan un incremento de la liberación noradrenérgica en el HIP al exponer a roedores ante novedad contextual, así el sistema noradrenérgico posiblemente participa en la adquisición de nuevos estímulos contextuales. Murchison y cols. (2004) apoyan la hipótesis de que el sistema noradrenérgico facilita la evocación de información contextual o espacial al poner a prueba la evocación de la memoria en el paradigma condicionamiento contextual al miedo evaluado a largo plazo (24 h) en ratones con carencia de NE y epinefrina, los sujetos exhibieron una ejecución deficiente, misma que se recuperó por la administración de un precursor de NE (L-DOPS) previo a la fase de evocación. Además, reportan que manipulaciones farmacológicas sobre los receptores adrenérgicos a nivel sistémico e intrahipocampal en sujetos control provocan alteraciones en la evocación del condicionamiento contextual al miedo y en el laberinto acuático. De esta forma, los autores sugieren que la NE en el HIP es crítica para evocar memorias contextuales y espaciales dependientes de HIP, además proponen que las vías entre el giro dentado y CA3 participan en el almacenamiento y evocación de la memoria.

Basados en estas evidencias es posible pensar que en nuestro trabajo, el incremento de DA que observamos en el HIP durante la fase de evocación puede relacionarse con la detección de saliencia causada por la modificación contextual y/o por el almacenamiento a largo plazo de la nueva representación contextual. Además las evidencias sobre las funciones que puede tener el siste-

ma noradrenérgico nos permite hipotetizar que el incremento de NE registrado en el HIP puede relacionarse también con la detección de saliencia por el cambio de ubicación de los objetos y/o con la evocación de la representación interna de los objetos almacenada en las sesiones de adquisición.

## **Glutamato y GABA**

En el presente trabajo, observamos ausencia de cambios significativos en la liberación del GLU en el HIP durante la fase de evocación de la *memoria de ubicación de objetos*. Dicho resultado no es congruente con los antecedentes que sugerían incremento en la liberación de GLU en el HIP al tiempo de evocar el componente de familiaridad (Stanley y cols., 2012), ni con las evidencias que sugieren que los receptores AMPA participan en la evocación del componente contextual (Barker y Warburton, 2013; Bast, da Silva y Morris, 2005) y en la evocación de información espacial (Day, Langston y Morris, 2003; Myhrer, 2003; Riedel y cols., 1999; Steele y Morris, 1999).

También observamos ausencia de cambios en la liberación de GABA en el HIP o en la CI a lo largo del procedimiento. Como indicamos previamente, la liberación gabaérgica en el HIP no se ha relacionado con la fase de evocación de la tarea que evalúa el componente de familiaridad (Stanley y cols., 2012), ni se ha observado un incremento en la liberación de GABA en el HIP ante novedad contextual (Giovannini y cols., 2001) pero la investigación concerniente al efecto del neurotransmisor GABA en el componente contextual es escasa. Andrews-Zwilling y cols. (2012) han evidenciado que las interneuronas gabaérgicas del giro dentado son importantes en el control de la recuperación de información espacial. Los autores inhibieron selectivamente las neuronas gabaérgicas por la técnica de optogenética al tiempo en que los roedores ejecutaron una evocación a largo plazo en el paradigma del laberinto acuático. La inhibición alteró la evocación de la memoria, sin afectar su retención, ni la memoria a corto plazo o la actividad exploratoria de los sujetos. Este reporte sugiere la importancia de la comunicación gabaérgica al tiempo en que se evoca información espacial dependiente de HIP.

Con base en los antecedentes y los hallazgos encontrados de la neurotransmi-

sión gabaérgica surge la necesidad de discutir las causas que pudiesen impedir el registro de cambios en los niveles extracelulares. Stanley y cols. (2012) sugieren que la ausencia de cambios en la concentración extracelular de GABA podría explicarse por las características espacio temporales del muestreo o por la eficiencia de la recuperación del muestreo; es decir, las neuronas gabaérgicas podrían presentar cambios muy fásicos y transitorios en la concentración extracelular, o bien que las distintas aferencias en el HIP conlleven efectos opuestos que resulten en ningún cambio neto en la concentración extracelular (Stanley y cols., 2012). La ausencia de cambios en la neurotransmisión de GABA también podría explicarse por la precisión de los métodos; si bien, la EF-FIL es una de las técnicas más sensibles para detectar analitos, podríamos encontrar limitaciones en los métodos previos a ésta, por ejemplo pérdida de un porcentaje del neurotransmisor durante el muestreo por microdiálisis, durante la reacción de derivatización o durante la misma detección. Por lo tanto, la ausencia de cambios en la actividad gabaérgica observada en el presente trabajo no necesariamente sugiere que dicho neurotransmisor carezcan de actividad funcional al inducir una evocación dependiente del componente contextual.

Utilizar lesiones permanentes, bloqueos temporales o manipulaciones en los receptores intrahipocampales son evidencias valiosas para apoyar la participación diferencial de las estructuras cerebrales y sugerir actividad funcional de la neurotransmisión. Sin embargo, estas aproximaciones podrían alterar otras funciones como la atención, motivación o percepción, enmascarando alteraciones en procesos cognoscitivos que no sean percibidos por el experimentador. Los resultados que obtuvimos durante la medición de los neurotransmisores nos permiten sugerir que las técnicas de microdiálisis en libre movimiento y la EC-FIL son métodos con precisión temporal suficiente para estudiar la asociación entre eventos neuroquímicos en regiones cerebrales particulares con procesos de memoria. Dichas técnicas anteceden a otras en el sentido de que registran la actividad neuroquímica y no la modifican; en cambio, preceden a aquellas técnicas que miden con mayor precisión temporal la asociación de actividad cerebral y los procesos cognoscitivos.

## 6.2 Disociación neuroquímica del componente contextual

Cuando los sujetos ejecutaron exitosamente la fase de evocación se observó que la concentración extracelular de DA y NE en HIP cambió, pero en la CI no registramos alteraciones en ninguno de los neurotransmisores analizados. Si recordamos que las estructuras, HIP y CI, están comprometidas diferencialmente con el componente contextual y el componente de familiaridad, respectivamente; entonces el monitoreo de los neurotransmisores que realizamos y la actividad neuroquímica diferencial observada en cada región, pueden ser las primeras evidencias que apoyan la propuesta de la disociación anatómica funcional al tiempo de la fase de evocación de la memoria de reconocimiento dependiente de contexto.

Varios grupos de investigación han examinado y revisado la doble disociación de la memoria de reconocimiento usualmente por lesiones o manipulaciones farmacológicas (Balderas y cols., 2008; Callaghan y Kelly, 2012; Cowell y cols., 2010). Wan, Aggleton y Brown (1999) examinaron una doble disociación de la memoria de reconocimiento sin alterar la comunicación neuroquímica, midiendo la actividad neuronal por expresión de la proteína Fos1<sup>1</sup>. Encontraron que una nueva disposición espacial de objetos (componente contextual) produjo cambios marcados en la actividad neuronal del HIP y la corteza POR, pero no en PER; en cambio, ante nuevas ilustraciones de objetos (componente de familiaridad) se observó la activación opuesta. Las evidencias de Wan y cols. (1999) son relevantes porque de forma similar a nuestro estudio, observan evidencias de la disociación del componente contextual sin producir alteraciones en la comunicación neuronal.

En conclusión, los cambios que observamos en la neurotransmisión dopaminérgica y noradrenérgica en el HIP, y la estabilidad de la neurotransmisión en la CI, apoyan la disociación de la memoria de reconocimiento a nivel neuroquímico.

---

<sup>1</sup>La proteína Fos1 puede medirse por inmunohistoquímica y es el producto del gen de expresión inmediata temprana c-fos.

### 6.3 Implicaciones de la evocación conductual

El paradigma de *reconocimiento espontáneo de objetos* es visto como un excelente paradigma para investigar los mecanismos neuronales que subyacen a los procesos de memoria -adquisición, consolidación o evocación- en roedores y que además permiten evaluar los componentes de la memoria de reconocimiento de forma independiente.

Operacionalmente, el proceso de evocación durante las tareas de reconocimiento espontáneo de objetos se induce según la separación hipotética de los demás procesos de memoria (adquisición y consolidación) precedidos temporalmente en las diferentes fases de las tareas; por lo tanto, el proceso de evocación se asume cuando el ambiente o circunstancias neuroquímicas producen la manifestación de la conducta (Spear, 2007). Para Murchison y cols. (2004) la evocación es un proceso más rápido comparado con la consolidación, de tal forma que el proceso de evocar debe requerir de cambios físicos en la neurotransmisión. Dicha propuesta es congruente con los resultados observados en el presente trabajo; sin embargo serán necesarios futuros trabajos que examinen qué otros procesos cognoscitivos intervengan en la neurotransmisión del HIP.

Además, estudiar el proceso de evocación en modelos animales tiene limitaciones que deben considerarse; por ejemplo, en las tareas de *reconocimiento espontáneo de objetos* los procesos perceptuales y atencionales son intrínsecos (Brown, Barker, Aggleton y Warburton, 2012), además los sujetos pueden presentar procesos cognoscitivos más complejos como una evocación asociativa o procesos más simples como la discriminación basada sólo en la familiaridad. Si bien el HIP presenta funciones especializadas que contribuyen diferencialmente a la evocación de un evento, no podemos asumir que el HIP soporte un proceso puro de evocación, ni que sea la única estructura relacionada con tal función. Por lo tanto, en relación a nuestros hallazgos asumimos que a partir de una modificación contextual hemos registrado procesos cognoscitivos que debe estar muy relacionado con la memoria de reconocimiento y con procesos perceptuales.

### 6.4 Trabajos futuros

Dado que encontramos pocas evidencias que prueben la neurotransmisión de la CI en los paradigmas de reconocimiento espontáneo de objetos, consideramos

necesarios estudios futuros que examinen la participación neuroquímica de la CI, como de la corteza PER durante la fase de evocación. Por la ausencia de alteraciones observadas en el monitoreo de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA en la CI durante la *memoria de ubicación de objetos* sería importante probar que al alterar la neurotransmisión de la CI no se afecta la memoria dependiente del componente contextual, pero si memorias dependiente del componente de familiaridad. De ser así, se fortalecería la hipótesis de una doble disociación entre cada componente de la memoria de reconocimiento y su dependencia con el HIP y la CI.

Sin duda, el incremento de la liberación de DA y NE que observamos en el HIP deberá fortalecerse con más estudios experimentales, por ejemplo que induzcan alteraciones por el bloqueo o destrucción de las neuronas dopaminérgica y noradrenérgica al tiempo de inducir la fase de evocación en las tareas que evalúan el componente contextual. Ya que registramos que la liberación de GLU mostró un decremento significativo en la última fracción recuperada sería importante indagar en futuros experimentos si esta disminución de la liberación se relaciona con alguna actividad funcional. Adicionalmente sería interesante prolongar la recuperación de muestras para los neurotransmisores DA, NE y GLU a fin de continuar observando su dinámica de liberación y el tiempo que tardan en regresar a los niveles basales. Por la estabilidad que observamos en la concentración de GABA, sería importante encontrar ausencia de alteraciones en la memoria al manipular la actividad los receptores gabaérgicos durante la fase de evocación; lo que permitirá apoyar la hipótesis de una participación secundaria de GABA en la evocación del recuerdo contextual.

El HIP es una estructura cerebral dividida en subregiones que reciben proyecciones neuroquímicas diferenciales, además se han sugerido que CA1 y CA3 presentan diferentes funciones relacionadas con la memoria de reconocimiento (Brun y cols., 2002; Lisman y Otmakhova, 2001; Murchison, Schutsky, Jin y Thomas, 2011); será relevante que mediante herramientas más selectivas se pueda monitorear la actividad neuroquímica de cada subregión de la red hipocampal y asociarlas con funciones más específicas.

Finalmente, el potencial de los estudios experimentales en roedores, específicamente en ratones, se fundamenta en el conocimiento detallado de las



bases neuroquímicas durante la cognición del cerebro sano, relevantes por la importancia de señalar posibles blancos farmacológicos para modelos de enfermedades en ratones transgénicos y knock-out. Particularmente, para nuestro trabajo resultan de interés los desordenes que han sido asociados con disfunciones dopaminérgicas como ocurre en el desorden por déficit de atención e hiperactividad, la enfermedad de Parkinson o esquizofrenia. La neurotransmisión dopaminérgica y noradrenérgica también es relevante en enfermedades asociadas con alteraciones en la recuperación de la memoria como son estados neurodegenerativos, depresión y psicosis de Korsakoff's (Murchison y cols., 2004).

## 7 Conclusiones

En el presente trabajo cumplimos el objetivo de estandarizar una tarea que evaluara el componente contextual y reflejara un exitoso indicador conductual de la memoria a largo plazo en ratones de la cepa B6129SF2/J. La microdiálisis en libre movimiento pudo adaptarse a la tarea y ello resultó en un protocolo efectivo para un muestreo continuo y simultáneo en el HIP y en la CI antes, durante y después de ejecutar la fase de evocación de la *memoria de ubicación de objetos*. Por EC-FIL identificamos la concentración de cada neurotransmisor presente en las muestras recuperadas a lo largo del protocolo.

Como esperábamos, los procesos cognoscitivos desencadenados al inducir la fase de evocación se reflejaron a nivel conductual, en la preferencia por explorar el objeto en la nueva ubicación; y a nivel sináptico, en identificar incrementos en la neurotransmisión de DA y NE en el HIP al momento de inducir una modificación contextual, mientras que en la CI no se presentaron modificaciones en la liberación de los neurotransmisores DA, NE, GLU y GABA; así, los resultados revelan una disociación a nivel neuroquímico de la estructura que participan en el componente contextual en el cerebro de ratones sanos. El que las regiones cerebrales estudiadas muestren actividad neuroquímica diferencial apoya la propuesta de la disociación anatómica funcional de la memoria de reconocimiento.

Los resultados expuestos proveen fuertes fundamentos del papel neuroquímico que ejerce el HIP, no así la CI, durante la fase de evocación del componente contextual. La literatura refiere algunas funciones hipocampales que nos permiten sugerir que el incremento registrado en la concentración de DA en el HIP puede estar muy relacionado con procesos perceptuales, detección y discriminación de novedad contextual. También podemos hipotetizar que el incremento que observamos en la liberación de NE en el HIP puede ser relevante al evocar la representación contextual previamente almacenada; o

bien, podría estar relacionado con la relevancia o saliencia del cambio contextual.

Finalmente, por ser una tarea que requiere aprendizaje incidental y evocación espontánea, proponemos que la *memoria de ubicación de objetos* es una prueba factible para delinear los correlatos neuroquímicos de la memoria y de procesos perceptuales dependientes del HIP, pero que aún requiere mucha investigación para refinar los aspectos teóricos de la cognición animal.

## Referencias

- Andrews-Zwilling, Y., Gillespie, A. K., Kravitz, A. V., Nelson, A. B., Devidze, N., Lo, I., ... Huang, Y. (2012, enero). Hilar GABAergic interneuron activity controls spatial learning and memory retrieval. *PloS one*, *7*(7), 1–12.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L. y Bermudez-Rattoni, F. (2008, septiembre). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & memory*, *15*(9), 618–24.
- Barker, G. R. I., y Warburton, E. C. (2011, julio). When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *Journal of Neuroscience*, *31*(29), 10721–10731.
- Barker, G. R. I., y Warburton, E. C. (2013, septiembre). Object in Place Associative Recognition Memory Depends on Glutamate Receptor Neurotransmission Within Two Defined Hippocampal Cortical Circuits: A Critical Role for AMPA and NMDA Receptors in the Hippocampus, Perirhinal, and Prefrontal Cortices. *Cerebral cortex*, *12*, 1–10.
- Barker, G. R. I., Warburton, E. C., Koder, T., Dolman, N. P., More, J., Aggleton, J., ... Brown, M. (2006, marzo). The different effects on recognition memory of perirhinal kainate and NMDA glutamate receptor antagonism: implications for underlying plasticity mechanisms. *The Journal of neuroscience*, *26*(13), 3561–6.
- Bast, T., da Silva, B. M. y Morris, R. G. M. (2005, junio). Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. *The Journal of neuroscience*, *25*(25), 5845–56.
- Bermudez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B. y McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*, 5379–5382.
- Binder, M. D., Hirokawa, N. y Windhorst, U. (2009). *Allocentric Reference Frame*. Encyclopedia of Neuroscience. Springer.
- Bredart, S. (2008). *Diccionario Akal de psicología* (R. Doron y F. Parot, Eds.). Madrid: Akal.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R. y Clark, R. E. (2004, octubre). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14515–20.
- Brown, M. W., y Aggleton, J. P. (2001, enero). Recognition Memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature reviews. Neuroscience*, *2*(1), 51–61.
- Brown, M. W., Barker, G. R. I., Aggleton, J. P. y Warburton, E. C. (2012, julio). What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia*, 1–19.
- Brun, V. H., Otnass, M. K., Molden, S., Steffenach, H.-A., Witter, M. P., Moser, M.-B. y Moser, E. I. (2002, junio). Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science*, *296*(5576), 2243–6.
- Bussey, T. J., Duck, J., Muir, J. L. y Aggleton, J. P. (2000, julio). Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behavioural brain research*, *111*(1-2), 187–202.
- Bussey, T. J., Muir, J. L. y Aggleton, J. P. (1999, enero). Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *The Journal of neuroscience*, *19*(1), 495–502.

- Callaghan, C. K., y Kelly, A. M. (2012, noviembre). Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus*, 22(11), 2127–35.
- Clark, R. E., y Squire, L. R. (2010, julio). An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia*, 48(8), 2234–44.
- Cooper, E. C., y Lowenstein, D. H. (2002). *Hippocampus* (n.º 1). Encyclopedia of life science. John Wiley & Sons.
- Cowell, R. A., Bussey, T. J. y Saksida, L. M. (2010, noviembre). Components of recognition memory: dissociable cognitive processes or just differences in representational complexity? *Hippocampus*, 20(11), 1245–62.
- Davis, S., Renaudineau, S., Poirier, R., Poucet, B., Save, E. y Laroche, S. (2010, enero). The formation and stability of recognition memory: what happens upon recall? *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 177.
- Day, M., Langston, R. y Morris, R. G. M. (2003). Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. *Nature*, 429, 205–209.
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P. y De Souza Silva, M. A. (2006, enero). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 30(8), 1206–24.
- Dix, S. L., y Aggleton, J. P. (1999, marzo). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural brain research*, 99(2), 191–200.
- Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory: Concepts, findings, trends*. (3.ª ed.). New York: Oxford University Press.
- Dudai, Y., Roediger, H. y Tulving, E. (2007). Memory. En H. Roediger, Y. Dudai y S. Fitzpatrick (Eds.), *Science of memory: concepts*. New York: Oxford University Press.
- Ennaceur, A., y Meliani, K. (1992, octubre). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behavioural brain research*, 51(1), 83–92.
- Ennaceur, A., Neave, N. y Aggleton, J. P. (1996). Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behavioural brain research*, 80(1-2), 9–25.
- Ennaceur, A., Neave, N. y Aggleton, J. P. (1997, marzo). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Experimental brain research*, 113(3), 509–19.
- Forwood, S. E., Winters, B. D. y Bussey, T. J. (2005, enero). Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus*, 15(3), 347–55.
- Frick, K. M., y Berger-Sweeney, J. (2001, febrero). Spatial reference memory and neocortical neurochemistry vary with the estrous cycle in C57BL/6 mice. *Behavioral neuroscience*, 115(1), 229–37.
- Frick, K. M., y Gresack, J. E. (2003, diciembre). Sex differences in the behavioral response to spatial and object novelty in adult C57BL/6 mice. *Behavioral neuroscience*, 117(6), 1283–91.
- Gasbarri, A., Sulli, A. y Packard, M. G. (1997, enero). The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 21, 1–22.
- Gaskin, S., Tardif, M. y Mumby, D. G. (2011, octubre). Prolonged inactivation of the hippocampus reveals temporally graded retrograde amnesia for unreinforced spatial learning in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 96(2), 288–96.
- Giovannini, M. G., Rakovska, A., Benton, R. S., Pazzagli, M., Bianchi, L. y Pepeu, G. (2001, enero). Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience*, 106(1), 43–53.
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J. L., Martínez-Coria, H., Laferla, F. M. y Bermúdez-Rattoni, F. (2012, enero). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates

- tes cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learning & memory*, 19(10), 453–60.
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P. y Bermúdez-Rattoni, F. (2010, julio). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of neurochemistry*, 114(1), 226–36.
- Haettig, J., Stefanko, D. P., Multani, M. L., Figueroa, D. X., McQuown, S. C. y Wood, M. A. (2011, febrero). HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learning & memory*, 18(2), 71–9.
- Halgren, E., Walter, R. D., Cherlow, D. G. y Crandall, P. H. (1978, marzo). Mental phenomena evoked by electrical stimulation of the human hippocampal formation and amygdala. *Brain : a journal of neurology*, 101(1), 83–117.
- Holz, R. W., y Fisher, S. K. (2006). Synaptic Transmission and Cellular Signaling: An Overview. En G. Siegel, R. W. Albers, S. Brady y D. Price (Eds.), *Neurochemistry. molecular, cellular, and medical aspects* (7.<sup>a</sup> ed., pp. 167–183). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Hong-Wei, D., y Allen Institute of Brain Science. (2008). *The Allen Reference Atlas: A Digital Color Brain Atlas of the C57BL/6J Male Mouse*. Wiley.
- Hotte, M., Naudon, L. y Jay, T. M. (2005, septiembre). Modulation of recognition and temporal order memory retrieval by dopamine D1 receptor in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 84(2), 85–92.
- Hughes, R. N. (2007, enero). Neotic preferences in laboratory rodents: issues, assessment and substrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 31(3), 441–64.
- Ihalainen, J., Riekkinen, P. y Feenstra, M. G. (1999, diciembre). Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neuroscience letters*, 277(2), 71–4.
- Ito, H. T., y Schuman, E. M. (2008, diciembre). Frequency-dependent signal transmission and modulation by neuromodulators. *Frontiers in neuroscience*, 2(2), 138–44.
- Kandel, E. R., y Siegelbaum, S. A. (2000). Overview of Synaptic Transmission. En E. R. Kandel, J. H. Schwartz y T. M. Jessell (Eds.), *Principles of neural science* (4.<sup>a</sup> ed., cap. 10). New York: McGraw-Hill.
- Lisman, J. E., y Grace, A. (2005, junio). The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, 46(5), 703–13.
- Lisman, J. E., y Otmakhova, N. A. (2001, enero). Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus*, 11(5), 551–68.
- Macbeth, A. H., Scharfman, H. E., Maclusky, N. J., Gautreaux, C. y Luine, V. N. (2009). Effects of multiparity on recognition memory, monoaminergic neurotransmitters, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Methods*, 54(1), 7–17.
- Manns, J. R., y Eichenbaum, H. (2009, octubre). A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learning & memory*, 16(10), 616–24.
- McClure, S. M., Daw, N. D. y Read Montague, P. (2003, agosto). A computational substrate for incentive salience. *Trends in Neurosciences*, 26(8), 423–428.
- Milner, B., y Taylor, L. (1972). Right-hemisphere superiority in tactile pattern-recognition after cerebral commissurotomy: Evidence for nonverbal memory. *Neuropsychologia*, 10(1), 1–15.
- Miranda, M. I., y Bermúdez-Rattoni, F. (2007, marzo). Cholinergic activity in the insular cortex is necessary for acquisition and consolidation of contextual memory. *Neurobiology of learning and memory*, 87(3), 343–51.
- Moreno, P. (2005). *Desarrollo de un método para la determinación de neurotransmisores mediante electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Moscovitch, M. (2007). Memory: Why the engram is elusive. En H. Roediger, Y. Dudai y S. Fitzpatrick (Eds.), *Science of memory: concepts*. New York: Oxford University Press.
- Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E. y Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learning & memory*, 9(2), 49–57.
- Murai, T., Okuda, S., Tanaka, T. y Ohta, H. (2007). Characteristics of object location

- memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. *Physiology & Behavior*, *90*, 116–124.
- Murchison, C. F., Schutsky, K., Jin, S.-H. y Thomas, S. A. (2011, mayo). Norepinephrine and  $\beta$ 1-adrenergic signaling facilitate activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons during contextual memory retrieval. *Neuroscience*, *181*, 109–16.
- Murchison, C. F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A. y Thomas, S. A. (2004, abril). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell*, *117*(1), 131–43.
- Myhrer, T. (2003, marzo). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews*, *41*(2-3), 268–287.
- Oliveira, A. M. M., Hawk, J. D., Abel, T. y Havekes, R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & Memory*(215), 155–160.
- Riedel, G., Micheau, J., Lam, A. G. M., Roloff, E. L., Martin, S. J., Bridge, H., . . . Morris, R. G. M. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature Neuroscience*, *2*(10), 898–905.
- Roediger, H. L. (2007). Retrieval. En H. L. Roediger, Y. Dudai y S. M. Fitzpatrick (Eds.), *Science of memory: concepts* (p. 207). New York: Oxford University Press.
- Roediger, H. L., Zaromb, F. M. y Goode, M. K. (2008). A Typology of Memory Terms. En J. H. Byrne (Ed.), *Learning and memory: A comprehensive reference* (pp. 11–24). CA, USA: Academic Press, Elsevier.
- Scoville, W. B., y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesion. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, *20*(11), 11–21.
- Spear, N. E. (2007). Retrieval: Properties and effects. En H. L. Roediger, Y. Dudai y S. M. Fitzpatrick (Eds.), *Science of memory: concepts* (pp. 215–219). New York: Oxford University Press.
- Squire, L. R., y Kandel, E. R. (2009). *Memory: From Mind to Molecules* (3.<sup>a</sup> ed.). Colorado: Roberts & Company.
- Squire, L. R., Stark, C. E. L. y Clark, R. E. (2004, enero). The medial temporal lobe. *Annual review of neuroscience*, *27*, 279–306.
- Squire, L. R., Wixted, J. T. y Clark, R. E. (2007, noviembre). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature reviews. Neuroscience*, *8*(11), 872–883.
- Stanford, S. C. (2001). Neurotransmitter Release. En R. A. Webster (Ed.), *Neurotransmitters, drugs and brain functions* (pp. 81–102). Chichester: John Wiley & Sons.
- Stanley, E. M., Wilson, M. A. y Fadel, J. R. (2012, marzo). Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. *Neuroscience letters*, *511*(1), 38–42.
- Steele, R. J., y Morris, R. G. (1999, enero). Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, *9*(2), 118–36.
- Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K. y Wood, M. A. (2009, junio). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(23), 9447–52.
- Sweatt, D. J. (2007). Retrieval: Molecular mechanisms. En H. L. Roediger, Y. Dudai y S. M. Fitzpatrick (Eds.), *Science of memory: concepts* (pp. 209–213). New York: Oxford University Press.
- Sweatt, D. J. (2010). *Mechanisms of memory* (2.<sup>a</sup> ed.). CA, USA: Academic Press, Elsevier.
- Vago, D. R., y Kesner, R. P. (2008, junio). Disruption of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus interferes with spatial working memory and novelty detection. *Behavioural brain research*, *189*(2), 273–83.
- Wan, H., Aggleton, J. P. y Brown, M. W. (1999, febrero). Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *The Journal of neuroscience*, *19*(3), 1142–8.
- Warburton, E. C., Baird, A. L., Morgan, A., Muir, J. L. y Aggleton, J. P. (2000, mayo). Disconnecting hippocampal projections to the anterior thalamus produces deficits on tests of spatial memory in rats. *The European journal of neuroscience*, *12*(5),

- 1714–26.
- Warburton, E. C., y Brown, M. W. (2010, julio). Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory. *Neuropsychologia*, 48(8), 2262–72.
- Wehr, T., Rodriguez-Diaz, R. y Zhu, M. (1998). *Capillary electrophoresis of proteins* (Chromatogr ed.). New York: Marcel Dekker.
- Wimmer, M. E., Hernandez, P. J., Blackwell, J. y Abel, T. (2011, agosto). Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. *Neurobiology of aging*, 1–5.
- Winters, B. D., y Bussey, T. J. (2005, abril). Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(17), 4243–51.
- Winters, B. D., Saksida, L. M. y Bussey, T. J. (2006, septiembre). Paradoxical facilitation of object recognition memory after infusion of scopolamine into perirhinal cortex: implications for cholinergic system function. *The Journal of neuroscience*, 26(37), 9520–9.
- Winters, B. D., Saksida, L. M. y Bussey, T. J. (2008, julio). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32(5), 1055–70.



## Apéndice

### Confiabilidad interobservadores

**Tabla 7.1** Porcentaje de correspondencia entre la duración de las exploraciones.

Observadores	Sesión adquisición		Sesión evocación		Total
	Objeto E	Objeto R	Nueva ubicación	Ubicación familiar	
1 vs. 2	84.7 % ±3.7 n = 50	78.5 % ±4.5 n = 50	54 % ±5 n = 40	86 % ±3.2 n = 40	76.6 % ±2.3 n = 180

**Tabla 7.2** .Coeficiente de correlación de Pearson por pares entre la duración de las exploraciones para cada objeto.

Observadores	Sesión adquisición		Sesión evocación		Total
	Objeto E	Objeto R	Nueva ubicación	Ubicación familiar	
1 vs. 2	0.942 < 0.0001 n = 50	0.759 < 0.0001 n = 50	0.808 < 0.0001 n = 40	0.985 < 0.0001 n = 40	0.863 < 0.0001 n = 180

### Ecuación para calcular tiempo muerto en microdiálisis

$$\begin{aligned}
 TM &= 212 \text{ mm} \left( \frac{1.8 \mu\text{L}}{100 \text{ mm}} \right) \left( \frac{1 \text{ min}}{0.25 \mu\text{L}} \right) = 15.26 = 15 \text{ min} \\
 &0.26 (60 \text{ s}) = 15.6 \simeq 16 \text{ s} \\
 &= 15 \text{ min } 16 \text{ s} \qquad (7.1)
 \end{aligned}$$

### Resultados de estandarización de protocolos

**Tabla 7.3** Estandarización de diferentes pares de objetos.

IE de diferentes pares de objetos				
Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5
A = .462 B = .538	C = .328 D = .672	E = .533 F = .467	B = .489 D = .511	A = .439 E = .561
A-B = 0.077	C-D = 0.345	E-F = 0.066	B-D = 0.023	A-E = 0.123
t <sub>3</sub> = 0.918	t <sub>3</sub> = 3.058	t <sub>3</sub> = 0.574	t <sub>3</sub> = 0.286	t <sub>3</sub> = 0.499
P = 0.426	P = 0.055	P = .606	P = 0.793	P = 0.651

**Tabla 7.4** Estandarización del *par 3* de objetos.

IE del <i>Par 3</i>	
$E = 0.533 \pm 0.028$	$D = 0.467 \pm 0.028$
$t_{22} = 1.210$ $P = 0.239$	

**Tabla 7.5** Índice de reconocimiento contextual durante el *reconocimiento de objetos en contexto*.

Reconocimiento de objetos en contexto		
<i>Contexto 1</i>	<i>Contexto 2</i>	<i>FE</i>
$O_1 = 0.524 \pm 0.059$	$O_1 = 0.468 \pm 0.063$	$OCF = 0.524 \pm 0.040$
$O_2 = 0.476 \pm 0.059$	$O_2 = 0.532 \pm 0.063$	$OCN = 0.476 \pm 0.040$
$IRC t_7 = 0.397$ $P = 0.703$	$IRC t_7 = -0.514$ $P = 0.623$	$IRC t_7 = 0.599$ $P = 0.716$

**Tabla 7.6** Índice de reconocimiento del objeto en la nueva ubicación durante la *memoria de ubicación de objetos*.

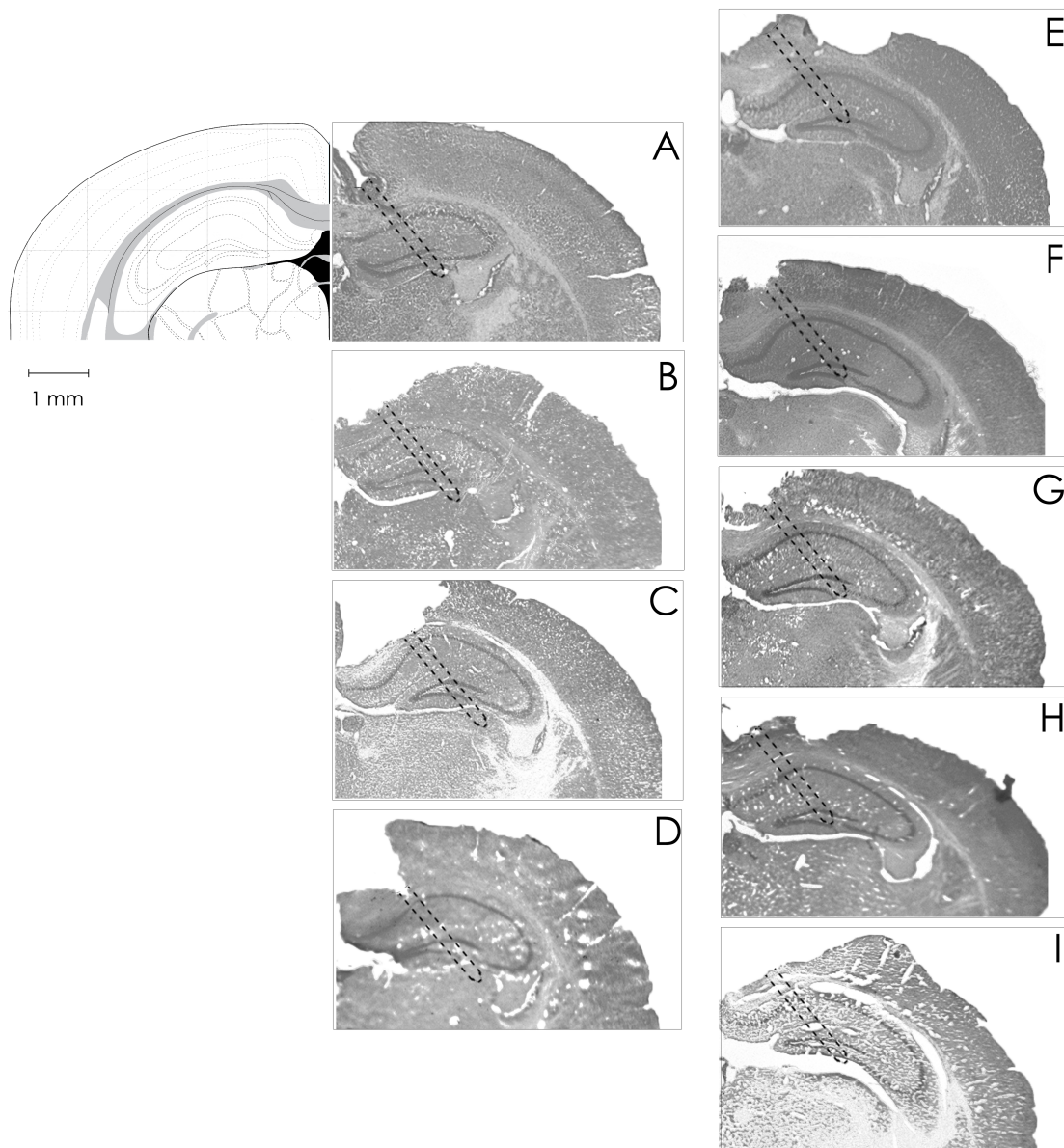
Memoria de ubicación de objetos.	
<i>SAx1</i>	<i>SAx2</i>
$NU = 0.558 \pm 0.043$	$NU = 0.674 \pm 0.061$
$NU t_9 = 1.363$ $P = 0.103$	$NU t_7 = 2.836$ $P = 0.012$

## Resultados del protocolo *memoria de ubicación de objetos* en sujetos canulados

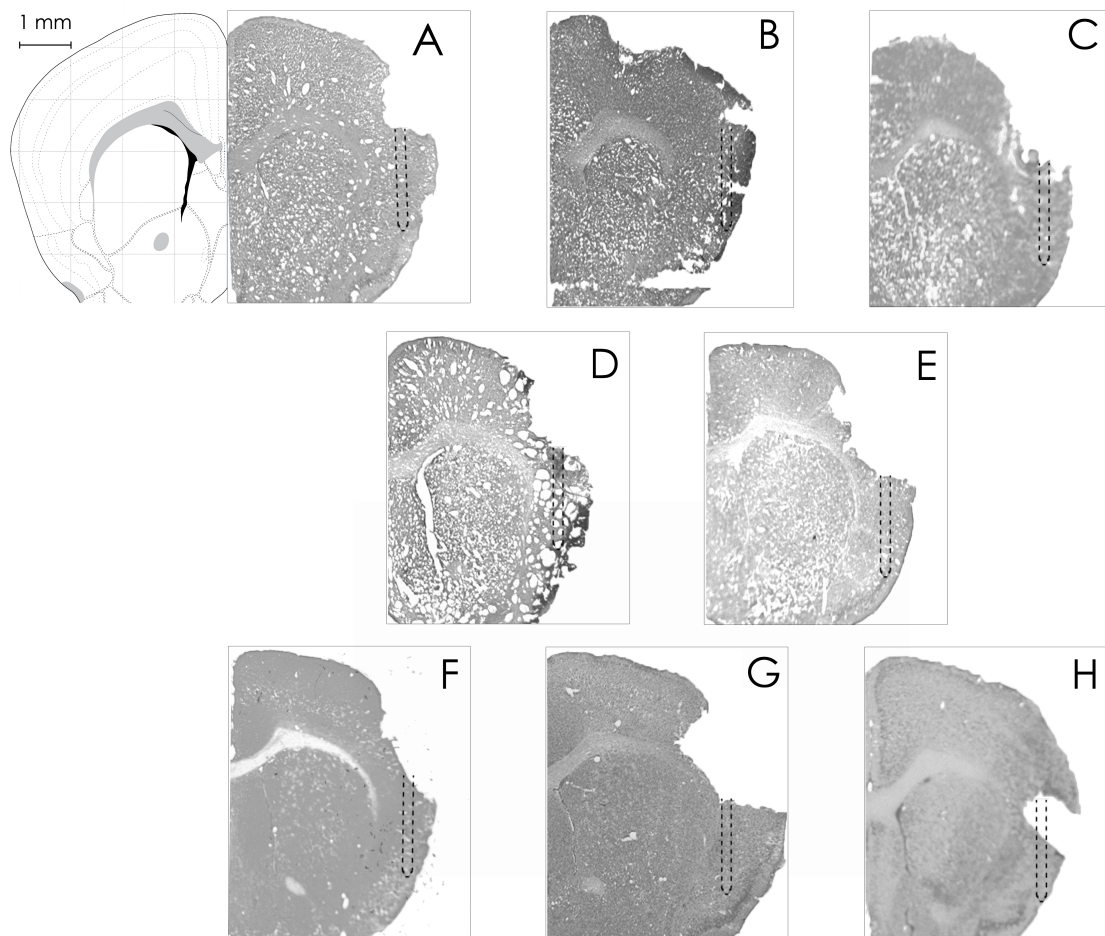
**Tabla 7.7** Índice de reconocimiento de la ubicación en la *memoria de ubicación de objetos* en el grupo microdializado.

Memoria de ubicación objetos.		
<i>SA1</i>	<i>SA2</i>	<i>FE</i>
$U_1 = 0.486 \pm 0.063$	$U_1 = 0.469 \pm 0.063$	$NU = 0.627 \pm 0.044$
$U_2 = 0.514 \pm 0.063$	$U_2 = 0.531 \pm 0.063$	$UF = 0.373 \pm 0.044$
$1292.22 \pm 284.13$	$1097.88 \pm 214.45$	$2345.77 \pm 343.20$
$t_8 = 0.227$ $P = 0.826$	$t_8 = 0.494$ $P = 0.634$	$NU t_8 = 2.896$ $P = 0.01$

## Resultados del análisis histológico



**Figura 7.1** Ejemplos de fotomicrografías digitales tomadas de cortes coronales seriales para los hipocampos de cada sujeto (A-I) con la tinción de Nissl. Se esquematiza la localización representativa de la membrana de microdiálisis en los hipocampos (hemisferio izquierdo).



**Figura 7.2** Ejemplos de fotomicrografías digitales tomadas de cortes coronales seriales para las cortezas insulares de cada sujeto (A-H) con la tinción de Nissl. Se esquematiza la localización representativa de la membrana de microdialisis en cada corteza insular.

## Resultados significativos en la prueba post-hoc para el análisis de los neurotransmisores

**Tabla 7.8** Análisis post-hoc de la liberación de DA.

Fracciones recuperadas en el HIP.		
<i>Fracción</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Valor P</i>
$F1 - F4$	-242.606	< 0.0001
$F1 - F6$	-169.334	0.0025
$F2 - F4$	-264.396	< 0.0001
$F2 - F5$	-102.328	0.0445
$F2 - F6$	-191.124	0.0008
$F3 - F4$	-207.715	0.0002
$F3 - F6$	-134.444	0.0135
$F4 - F5$	162.067	0.0024

**Tabla 7.9** Análisis post-hoc de la liberación de NE.

Fracciones recuperadas en el HIP.		
<i>Fracción</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Valor P</i>
$F1 - F4$	-135.682	0.0167
$F2 - F4$	-115.789	0.0393
$F3 - F4$	-142	0.0126
Fracciones recuperadas en la CI.		
<i>Fracción</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Valor P</i>
$F4 - F6$	-45.255	0.0095
$F5 - F6$	-48.562	0.0104

**Tabla 7.10** Análisis post-hoc de la liberación de GLU.

Fracciones recuperadas en el HIP.		
<i>Fracción</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Valor P</i>
$F1 - F2$	46.847	0.0272
$F1 - F3$	45.257	0.0385
$F1 - F4$	46.679	0.0331
$F1 - F5$	86.952	0.0001
$F1 - F6$	96.620	< 0.0001
$F2 - F6$	49.773	0.0236
$F3 - F6$	51.362	0.0237
$F4 - F6$	49.941	0.0276