

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
PSICOLOGÍA

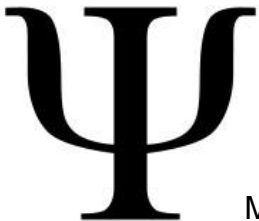
POSIBLE INTERACCIÓN DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LOS
ENDOCANNABINOIDES EN EL ESTRIADO DORSAL SOBRE LA
CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA
P R E S E N T A:
ANTONIO FUENTES IBAÑEZ

PAPIIT-UNAM IN202414

JURADO DE EXAMEN

TUTORA: DRA. GINA LORENA QUIRARTE
COMITÉ: DR. ALEJANDRO VALDÉS CRUZ
DRA. LILIA MESTAS HERNÁNDEZ
DR. VÍCTOR MANUEL MAGDALENO MADRIGAL
MTRO. CÉSAR AUGUSTO DE LEÓN RICARDI



MÉXICO, D.F.

ABRIL 2015



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Gina Lorena Quirarte en el Laboratorio de Aprendizaje y Memoria del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, Querétaro, México.

AGRADECIMIENTOS

A los profesionales de las neurociencias que compartieron su conocimiento conmigo y cuyo ejemplo explícito o implícito contribuyó a mi formación académica: Dr. Federico Bermúdez Rattoni, Dr. Ignacio Ramírez Salado, Dr. Lenin Pavón Romero, Dr. Miguel Ángel Villa Rodríguez, Dr. Óscar Prospéro García, y Dr. Víctor Manuel Magdaleno Madrigal.

A todos los integrantes del laboratorio de Aprendizaje y Memoria del Instituto de Neurobiología de la UNAM por su camaradería. A la M.V.Z. Norma Serafín López y la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso, por el apoyo técnico brindado. Al Sr. Ángel Méndez Olalde, por su gran ayuda como laboratorista. Especialmente a la Dra. Gina Lorena Quirarte, directora de la presente tesis, por la oportunidad y la confianza brindada; y a la Mtra. Cristina Siller Pérez, amiga, por su invaluable apoyo y retroalimentación académica en el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica y la beca para desarrollar este proyecto (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM IN202414).

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología y de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (Psicología):

Enseñanza: Mtra. Leonor Casanova Rico.

Bioterio: M.V.Z. Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla.

Cómputo: Ing. Ramón Martínez Olvera, Omar González Hernández y I.S.C. Sandra Hernández García.

Biblioteca: Lic. Francisco Javier Valles Valenzuela, Lic. Soledad Medina Malagón y Rafael Silva Cruz.

Videoconferencia: Lic. Lourdes Lara Ayala.

Secretario técnico: Lic. Eduardo Arturo Contreras Ramírez.

DEDICATORIA

A mi familia

ÍNDICE

Agradecimientos	II
Dedicatoria	III
Resumen	VI
Abreviaturas	VII
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Conceptos básicos de aprendizaje y memoria	2
2.2 Los glucocorticoides y la memoria	8
2.3 El sistema endocannabinoide y la memoria	12
2.4 Aspectos básicos sobre el estriado dorsal	15
3. Planteamiento del problema	19
3.1 Pregunta de investigación	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivo	20
5.1 Objetivos específicos	20
6. Material y métodos	20
6.1 Sujetos	21
6.2 Cirugía para la implantación de cánulas	21
6.3 Tarea de evitación inhibitoria	22
6.3.1 Aparatos	22
6.3.2 Procedimiento	23

6.4 Administración de sustancias	24
6.4.1 Metirapona	24
6.4.2 WIN55,212-2	25
6.5 Diseño experimental	25
6.5.1 Experimento 1	26
6.5.2 Experimento 2	27
6.6 Verificación histológica	28
6.7 Análisis estadísticos y variables	29
7. Resultados	30
7.1 Experimento 1	30
7.2 Experimento 2	31
8. Discusión	33
9. Conclusiones	38
10. Perspectivas	39
11. Referencias bibliográficas	40

RESUMEN

Los glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en roedores) son hormonas que pueden actuar sobre diversas estructuras cerebrales facilitando la consolidación de la memoria. Investigaciones recientes, proponen que los glucocorticoides y el sistema endocannabinoide interactúan para regular el proceso de memoria. A este respecto, se ha reportado que la administración directa de corticosterona en el estriado dorsal puede facilitar la consolidación de la memoria de una tarea aversiva. Sin embargo, en dicha estructura no se ha evaluado si la corticosterona puede interactuar con el sistema endocannabinoide en la regulación de la formación de la memoria como previamente se ha mostrado en otras estructuras. Para abordar este tópico, se utilizaron ratas *Wistar* macho. Primeramente se investigó si la administración bilateral en el estriado dorsal del agonista cannabinoide WIN55,212-2, inmediatamente después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria, podría facilitar la consolidación de la memoria evaluada 48 horas después. Posteriormente, se investigó si la disminución de los niveles de corticosterona podían bloquear el efecto facilitador del WIN55,212-2. Para ello, se administró por vía intraperitoneal metirapona, un inhibidor de la síntesis de glucocorticoides, 90 minutos antes del entrenamiento de la tarea. Los resultados indican que la administración directa de WIN55,212-2 en el estriado dorsal facilita la consolidación de la memoria dependiendo de la dosis utilizada y que la administración previa de metirapona bloquea este efecto. En conjunto, los datos indican que la acción concurrente del WIN55,212-2 en el estriado dorsal y los niveles de corticosterona son necesarios para facilitar la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria. Por lo que se sugiere que en condiciones fisiológicas el sistema endocannabinoide y los glucocorticoides actúan en conjunto en estructuras como el estriado dorsal para mediar la consolidación de memorias aversivas.

ABREVIATURAS

ACTH Hormona adrenocorticotrópica o corticotropina
AEA Araquidoniletanolamida o anandamida
BLA Amígdala basolateral
CB1 Receptores a cannabinoides tipo 1
CB2 Receptores a cannabinoides tipo 2
CRH Hormona liberadora de corticotropina
DMSO Dimetil sulfóxido
EC Estímulo condicionado
ED Estriado dorsal
EI Estímulo incondicionado
FAAH Hidrolasa amida de los ácidos grasos
GPe Globo pálido externo
GPI Globo pálido interno
GRs Receptores a glucocorticoides
HHA Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
RC Respuesta condicionada
RI Respuesta incondicionada
MAGL monoacilglicerol lipasa
MCP Memoria de corto plazo
MLP Memoria de largo plazo
MRs Receptores a mineralocorticoides
NST Núcleo subtalámico
NT Neurotransmisor
SNr Sustancia negra pars reticulada
THC Tetrahidrocannabinol
2AG 2-araquidonilglicerol

1. INTRODUCCIÓN

La memoria es una de las mejores estrategias que tienen los organismos para hacer frente a los retos de su ambiente. La memoria, resultado de la experiencia o la práctica, tiene sustento físico en el sistema nervioso. La expresión de la memoria puede darse a través de recuerdos vividos o de la eficiencia conductual. El estudio de la memoria requiere descripciones verbales y conductuales, y de forma paralela y convergente, descripciones en términos celulares y moleculares de los mecanismos empleados durante la adquisición de la información y los procesos que permiten la retención y persistencia de la memoria. En este sentido, experiencias o estímulos vinculados a la excitación emocional, como situaciones estresantes, tienden a formar recuerdos duraderos. Los glucocorticoides, hormonas secretadas en las glándulas adrenales durante situaciones estresantes, participan en la regulación de la memoria. Diversas investigaciones han mostrado que los glucocorticoides pueden actuar sobre estructuras cerebrales como el hipocampo y la amígdala facilitando la formación de la memoria (McGaugh & Roozendaal, 2002). Además, se ha propuesto que los glucocorticoides actúan en conjunto con otras moléculas, como los endocannabinoides, relacionadas con la regulación de la comunicación sináptica, para llevar a cabo su acción sobre la memoria (Atsak, Roozendaal, & Campolongo, 2012). Sin embargo, aún no hay reportes que evalúen la relación glucocorticoides-endocannabinoides en el estriado, estructura relacionada con la memoria de tipo procedimental.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Conceptos básicos de aprendizaje y memoria

El aprendizaje es un cambio potencial o relativamente permanente en la conducta de un organismo debido a la experiencia o la práctica, y la memoria es el proceso por el cual se almacena y expresa dicho cambio (Kandel, 2013). Para su estudio, la memoria puede ser analizada por: a) las etapas del proceso (adquisición, consolidación y evocación) b) la duración de la información almacenada (memoria de corto y largo plazo) y c) la cualidad de la información almacenada (memoria explícita o implícita).

En 1885, Hermann Ebbinghaus fue el primero en estudiar de forma experimental el proceso mnémico (Kandel, 2007). Realizó estudios en los cuales cuantificó la retención de palabras sin sentido (consonante-vocal-consonante) para prevenir la influencia de significados preexistentes. Ebbinghaus mostró que la información persiste por un tiempo breve (varios minutos), que la memoria es gradual y que había una relación lineal entre el número de repeticiones del primer día y el material recordado en el segundo. Se dio cuenta que se podía aprender y recordar una lista de seis o siete elementos con una única presentación, mientras que una lista más larga exigía presentaciones repetidas. Además, describió que el olvido tiene por lo menos dos fases: una fase inicial de declinación rápida mucho más aguda en la primera hora posterior al aprendizaje, y una fase posterior de declinación mucho más gradual que abarcaba más o menos un mes (Kandel, 2007).

Posteriormente, en 1890 William James, apoyándose en las dos fases del olvido descritas por Ebbinghaus concluyó que la memoria abarca por lo menos dos procesos diferentes (Kandel, 2007): un proceso de corto plazo que denominó memoria primaria y otro de largo plazo que llamó memoria secundaria. Así, se formaron las bases de la categorización moderna de la memoria en función del tiempo de almacenamiento de la información. La memoria de corto plazo (MCP), con una duración de minutos u horas; y la memoria de largo plazo (MLP), con una duración de días, meses o años.

En 1900, los psicólogos alemanes Georg Müller y Alfons Pilzecker, usando protocolo similar al de Ebbinghaus, reportaron que la estabilización de una memoria es interrumpida si se expone a nuevos estímulos poco después de la adquisición inicial (Kandel, 2007). Esto derivó en la noción de que las memorias en un inicio son lábiles y posteriormente se estabilizan con el paso del tiempo, este proceso es denominado consolidación. Las memorias recientemente formadas no sólo son susceptibles a interferencia por estímulos sino a una variedad de circunstancias que suceden después de la adquisición como, por ejemplo, traumatismos craneoencefálicos, choques electroconvulsivos e inhibidores de la síntesis de proteínas (Dudai, 2004; Kandel, 2013). Los efectos sobre la memoria disminuyen conforme se incrementa el intervalo de tiempo entre la adquisición y estos.

El término consolidación se refiere a dos tipos de procesos (Dudai, 2004): el primero es la consolidación celular o sináptica, que ocurre dentro de los primeros minutos u horas después de la adquisición y se refiere a los eventos bioquímicos y

moleculares que se producen en los circuitos neuronales que codifican la representación interna de la experiencia; incluyendo cambios en las vías de señalización y alteración en la síntesis de proteínas que produce cambios más duraderos en las sinapsis. El segundo es la consolidación de sistemas o lenta, cuya duración es mucho mayor y toma semanas, meses o años para completarse y se piensa que involucra cambios en las interacciones entre los circuitos neuronales o sistemas que codifican la memoria (Figura 1).

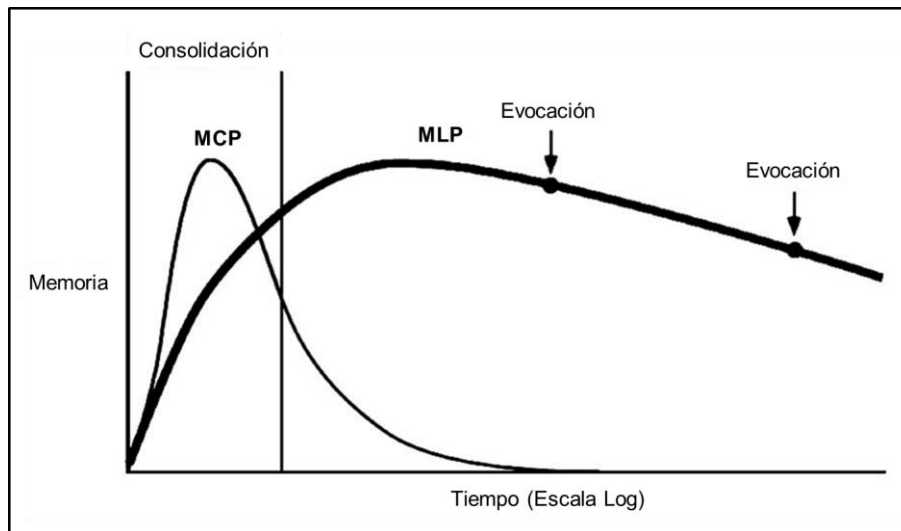


Figura 1. La consolidación es el proceso por el cual las memorias lábiles en un principio se vuelven estables y persistentes a través del tiempo. Modificado de Dudai (2004).

El proceso mnémico consta de diferentes etapas: 1) Adquisición: durante esta etapa, los organismos codifican la información de los estímulos a los cuales están expuestos durante su interacción con el medio ambiente; en otras palabras el organismo aprende. 2) Consolidación: proceso de estabilización progresiva de la memoria posterior a la adquisición y cuyos mecanismos moleculares involucran la

síntesis de proteínas (Dudai, 2004). 3) Evocación: recuperación voluntaria o espontánea de la información adquirida y almacenada.

La memoria de largo plazo está conformada por dos grandes categorías de la información, el sistema de memoria explícita y el sistema de memoria implícita (Figura 2). El término sistema de memoria se refiere a la participación diferencial de estructuras cerebrales que son reclutadas para el proceso mnémico dependiendo del tipo de información (Squire & Wixted, 2011). Evidencia experimental y clínica muestra que la memoria explícita está relacionada con el hipocampo y el lóbulo temporal mientras que la memoria implícita está relacionada con el estriado, la corteza cerebral, el cerebelo, la amígdala y las vías reflejas (Eichenbaum, 2010; Packard, 2009). Asimismo, se ha demostrado que estos sistemas de memoria son dissociables (Wingard & Packard, 2008). En humanos se conoce como la memoria explícita a la representación consciente de eventos pasados. Ésta, a su vez puede dividirse en dos: episódica y semántica. La memoria episódica, se refiere a la información sobre experiencias personales específicas, como: recordar un viaje o el primer día de universidad. La memoria semántica, hace referencia a la información que no está unida a un hecho específico de la experiencia personal: como la fórmula del agua (H₂O), la capital de Francia, etcétera (Kolb & Whishaw, 2009; Portellano, 2005; Rians, 2003). En contraste, en la memoria implícita la experiencia pasada se expresa por medio de la conducta. Por ejemplo, la ejecución de habilidades motoras (conducir un automóvil), habilidades perceptuales (leer rápido) o habilidades cognitivas (métodos para resolver un rompecabezas). El tipo de información almacenada

como consecuencia del aprendizaje no asociativo (habituaación y sensibilización), el condicionamiento clásico, y el *priming* (el efecto facilitador no consciente de la experiencia previa sobre la percepción y otros procesos, en ausencia de la recolección consciente de experiencias previas) están incluidos en la memoria implícita (Rians, 2003).

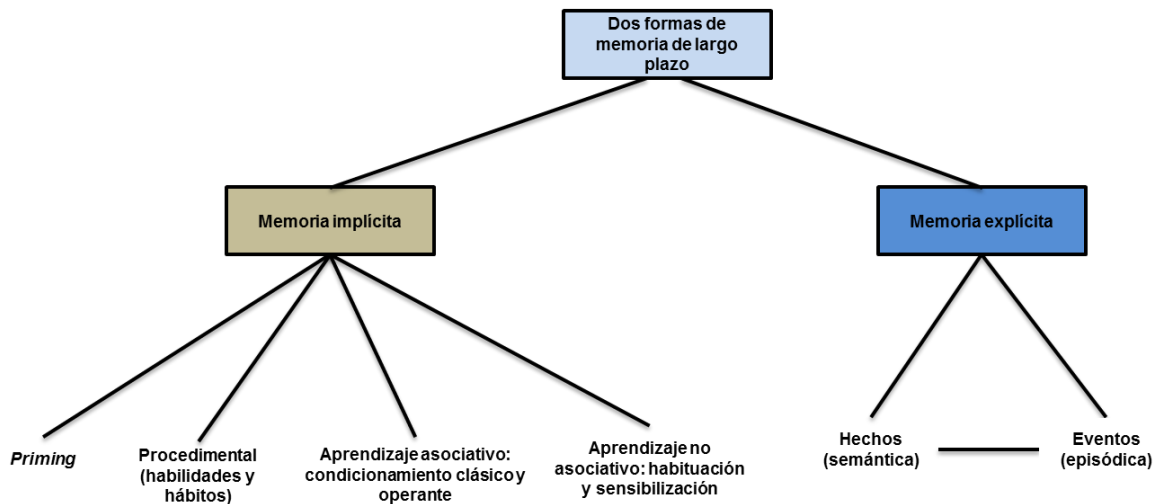


Figura 2. La memoria de largo plazo puede ser implícita o explícita. Modificado de Kandel (2013).

En neurociencias, el aprendizaje asociativo ha sido ampliamente usado en protocolos de investigación básica. Éste permite inferir el aprendizaje y la memoria por medio de la ejecución y cuantificación de la conducta de manera que se puede establecer un correlato entre las condiciones experimentales y el desempeño en una determinada tarea o condición. El aprendizaje asociativo puede dividirse en dos, el condicionamiento clásico o pavloviano y el condicionamiento operante o instrumental. El condicionamiento clásico es el tipo de aprendizaje que se establece apareando (asociando) un estímulo neutro, que no produce respuestas

reflejas específicas (estímulo condicionado, EC), con un estímulo que puede producir una respuesta específica. A este segundo estímulo se le llama estímulo incondicionado (EI); a la respuesta refleja producida por el EI se le llama respuesta incondicionada (RI). Después varias asociaciones, el EC puede producir, por sí mismo, la respuesta refleja, la cual recibe el nombre de respuesta condicionada (RC) (Coon, 2009; Prado-Alcalá, 1991). En contraste, en el condicionamiento operante un organismo emite espontáneamente respuestas que forman parte de su repertorio conductual, y si alguna de esas respuestas es seguida por algún evento o estímulo favorable para el organismo, entonces esa respuesta tenderá a repetirse, o por el contrario si el estímulo es desagradable para el organismo la respuesta tenderá a suprimirse. A las respuestas espontáneas de un organismo se les llama operantes; y al estímulo que promueve que una respuesta se repita se le llama reforzador. Así, un reforzador es cualquier estímulo o evento que incrementa la probabilidad de que una respuesta se repita, y al proceso por el cual una respuesta se asocia con un estímulo reforzador se le llama reforzamiento (Coon, 2009; Prado-Alcalá, 1991). Al estímulo que promueve la disminución de la respuesta se le llama castigo.

Se ha determinado la existencia de fases que se establecen en ambos tipos de condicionamiento (Coon, 2009; Prado-Alcalá, 1991): adquisición (cuando se incrementa el número de respuestas), mantenimiento (cuando el nivel de respuestas condicionadas alcanza un máximo), generalización (cuando un organismo presenta la respuesta condicionada ante la presencia de un estímulo similar al estímulo que originalmente fue asociado con la respuesta condicionada),

discriminación (cuando ante la presencia de varios estímulos, únicamente se da la respuesta con el estímulo al que originalmente se asoció tal respuesta), extinción (cuando el organismo deja de ejecutar respuestas condicionadas, por haberse omitido la presentación del estímulo al que se asoció anteriormente) y recuperación espontánea (la reaparición eventual de la respuesta condicionada cuando el organismo es estimulado otra vez).

2.2 Los glucocorticoides y la memoria

Los glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en ratas) son hormonas esteroides secretadas de la corteza de las glándulas adrenales que durante condiciones fisiológicas basales regulan el metabolismo, pero en respuesta a situaciones estresantes (físicas o psicológicas) incrementan su síntesis y liberación (Tortora & Derrickson, 2013). Los glucocorticoides pueden actuar sobre una variedad de células diana, incluyendo blancos neuronales, ya que pueden atravesar la barrera hematoencefálica (McGaugh & Roozendaal, 2002). Participan en la regulación de degradación de proteínas, formación de glucosa, lipólisis y resistencia al estrés (Tortora & Derrickson, 2013). Además, pueden actuar sobre diversas estructuras cerebrales que participan en la consolidación de la memoria facilitando este proceso (McGaugh & Roozendaal, 2002).

El control de la secreción de los glucocorticoides se produce a través de un sistema de retroalimentación negativa conocido como el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA). Los niveles sanguíneos bajos de glucocorticoides o un evento estresante (por ejemplo: calor o frío, contaminantes ambientales, toxinas de las

bacterias, sangrado profuso o una reacción emocional intensa) estimulan a las células neurosecretoras en el hipotálamo a secretar hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés). La CRH promueve la liberación de la hormona adrenocorticotrópica o corticotropina (ACTH, por sus siglas en inglés) en la adenohipófisis. La ACTH es transportada por el torrente sanguíneo y al llegar a la corteza adrenal estimula la secreción de glucocorticoides. A su vez, un nivel elevado de glucocorticoides, inhibe la liberación de ACTH por las células corticotrópicas de la adenohipófisis e inhibe la liberación de CRH por las hormonas neurosecretoras hipotalámicas (Tortora & Derrickson, 2013) (Figura 3). Aunado a esto, se ha reportado que en respuesta a los niveles de glucocorticoides, los endocannabinoides regulan negativamente la secreción de éstos a través de la supresión de la liberación de glutamato en neuronas hipotalámicas del núcleo paraventricular que produce CRH, lo cual inhibe rápidamente la secreción de la hormona (Hill & McEwen, 2010).

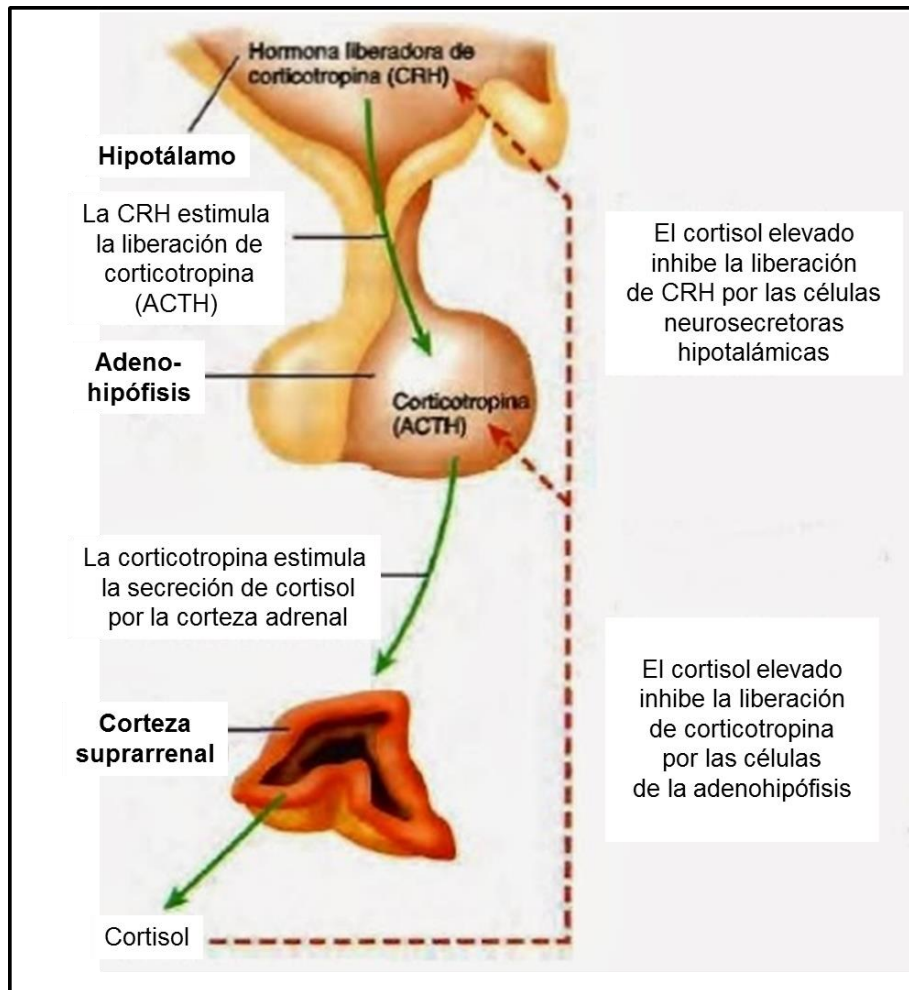


Figura 3. Esquema del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal humano. Modificado de Tortora y Derrickson (2013).

Los glucocorticoides llevan a cabo su efecto acoplándose a dos tipos de receptores: los receptores a mineralocorticoides y los receptores a glucocorticoides (MRs y GRs, respectivamente). Ambos están presentes en el sistema nervioso central y tejidos periféricos (Akirav, 2013). En el cerebro, los GRs se expresan densamente en el hipocampo, septum, y el núcleo paraventricular del hipotálamo y moderadamente expresados en el estriado, la amígdala y la corteza cerebral (Morimoto, Morita, Ozawa, Yokoyama, & Kawata, 1996). Mientras que los

MRs se encuentran densamente expresados en el hipocampo. Los MRs son 10 veces más afines a la corticosterona con respecto a los GRs, y se encuentran saturados bajo condiciones basales. Los GRs presentan una menor afinidad a la corticosterona y son ocupados sólo durante el pico circadiano (el momento del día en el que los niveles de glucocorticoides están altos) y en situaciones estresantes (Rooyendaal, 2000).

Los glucocorticoides pueden modular las diferentes etapas del proceso mnémico tanto en humanos como en modelos animales (Akirav et al., 2004; Guenzel, Wolf, & Schwabe, 2013; Lozano et al., 2000; Rooyendaal, 2002; Rooyendaal, Okuda, de Quervain, & McGaugh, 2006; Takatsu-Coleman et al., 2013). Estos pueden tener efectos duales sobre la memoria, por ejemplo, la administración de glucocorticoides antes de la evocación de la memoria puede producir deterioro en la misma (Rooyendaal, 2002; Rooyendaal et al., 2006); mientras que la administración de glucocorticoides inmediatamente después de una experiencia de aprendizaje pueden facilitar la consolidación de la memoria (Fornari, Wichmann, Atucha, Desprez, Eggens-Meijer, & Rooyendaal, 2012; Lozano, Serafín, Prado-Alcalá, Rooyendaal, & Quirarte, 2013). En el caso de la consolidación, los glucocorticoides y los agonistas a GRs pueden actuar sobre diversas estructuras cerebrales facilitando la consolidación de la memoria (Rooyendaal, 2002; Rooyendaal et al., 2006). Además, inhibidores de la síntesis de glucocorticoides (metirapona y aminoglutetimida) deterioran la consolidación (Loscertales, Rose, & Sandi, 1997). Estos resultados sugieren que los glucocorticoides llevan su a cabo su efecto sobre la consolidación a través de la

activación de los GRs y no los MRs. Sin embargo, el efecto de los glucocorticoides sobre la memoria puede estar mediado por otras moléculas, como los endocannabinoides (de Oliveira Alvares et al., 2010), cuya participación en la regulación de la secreción de los glucocorticoides ha sido destacada (Hill & McEwen, 2010).

2.3 El sistema endocannabinoide y la memoria

El sistema endocannabinoide, es un sistema de señalización lipídico que, en el sistema nervioso, puede modular la liberación de los neurotransmisores de forma presináptica y está constituido por los receptores a cannabinoides, los endocannabinoides y las enzimas responsables de la síntesis, degradación y recaptura de los endocannabinoides (Svizenska, Dubovy, & Sulcova, 2008).

Los blancos de los compuestos cannabinoides son los receptores a cannabinoides tipo 1 y tipo 2 (CB1 y CB2, respectivamente). Los principales ligandos para los receptores CB1 y CB2 son la araquidoniletanolamida o anandamida (AEA, por sus siglas en inglés) y el 2-araquidonilglicerol (2AG) (endocannabinoides); sin embargo, los receptores a cannabinoides también pueden ser activados por fitocannabinoides como el Δ -9 tetrahidrocannabinol (THC), producido por la planta *Cannabis sativa* y cannabinoides sintéticos (como el WIN55,212-2) (Atsak et al., 2012). La AEA actúa como un agonista parcial de los receptores CB1 y CB2, mientras que el 2AG es un agonista completo de dichos receptores.

En contraste con los neurotransmisores clásicos, los endocannabinoides no son almacenados en vesículas, sino que son sintetizados a partir de lípidos en la

membrana de la postsinapsis de forma dependiente de la actividad como consecuencia del aumento intracelular de calcio. Una vez que son liberados desde la postsinapsis a la hendidura sináptica, viajan de manera retrógrada y se acoplan a los receptores a cannabinoides expresados en la terminal presináptica. La activación de los receptores CB1 inhibe la liberación de neurotransmisor modulando diversos canales iónicos y quinasas. Posteriormente, la AEA y el 2AG son degradados por sus respectivas enzimas: la hidrolasa amida de los ácidos grasos (FAAH, por sus siglas en inglés) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente (Kandel, 2013; Svizenska et al., 2008) (Figura 4).

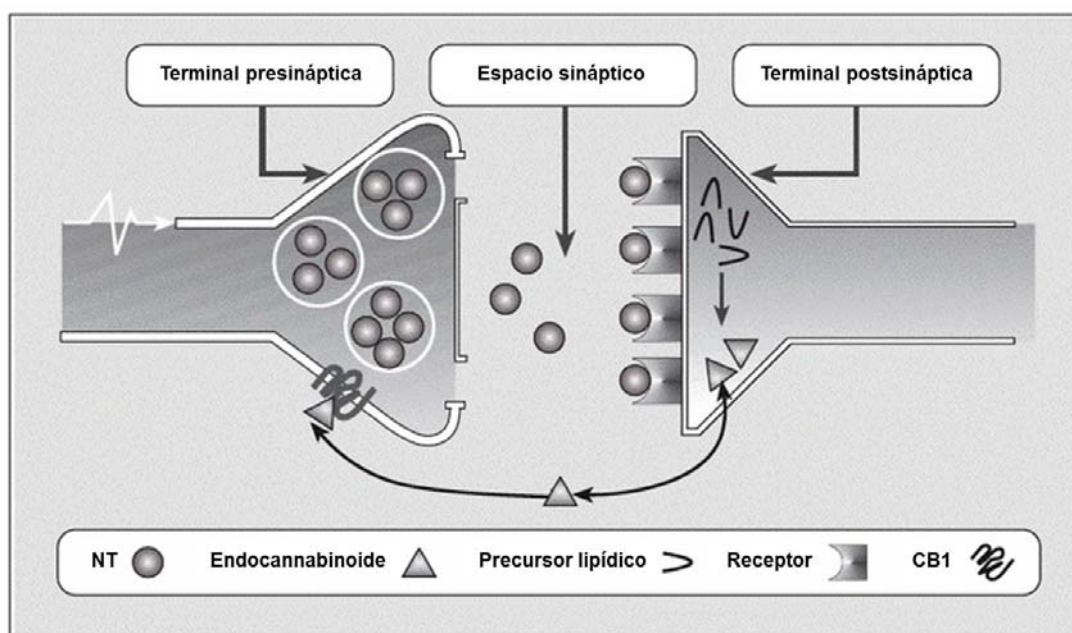


Figura 4. Los endocannabinoides son sintetizados a partir de lípidos en la membrana postsináptica como consecuencia del aumento intracelular de calcio, una vez que son liberados en el espacio sináptico viajan de manera retrógrada y se acoplan a los receptores a los receptores CB1 expresados en la terminal presináptica, regulando la liberación de los neurotransmisores a través de la modulación de diversos canales iónicos y quinasas. NT: neurotransmisor; CB1: receptor a cannabinoide tipo 1. Modificado de Formiguera y Sierra (2007).

El receptor CB1 es un receptor metabotrópico, y representa el más abundante receptor acoplado a proteínas G en el sistema nervioso central y está también presente en tejidos periféricos. Es un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a una proteína Gi/o, que inhibe la adenilato ciclasa, activa canales de potasio e inhibe canales de calcio dependientes de voltaje. El receptor CB1 se encuentra distribuido ampliamente en el sistema nervioso central, tanto de humanos como de ratas, sin embargo, hay estructuras en las que presenta mayor expresión como el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala basolateral (BLA, por sus siglas en inglés), el cerebelo y el estriado (Romano-Lopez, Mendez-Diaz, Ruiz-Contreras, Carrisoza, & Prospero-Garcia, 2012; Tsou, Brown, Sanudo-Pena, Mackie, & Walker, 1998; Van Waes, Beverley, Siman, Tseng, & Steiner, 2012). En dichas estructuras el receptor CB1 es altamente expresado en interneuronas GABAérgicas y en niveles moderados en terminales glutamatérgicas (Herkenham, Lynn, de Costa, & Richfield, 1991). El receptor CB1 también ha sido detectado en terminales serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas (Lau & Schloss, 2008). Por otro lado, el receptor CB2, igualmente es un receptor acoplado a una proteína Gi/o, pero se encuentra localizado principalmente en tejidos inmunológicos periféricos (Kandel, 2013). Sin embargo, recientemente se ha reportado la presencia de CB2 en células gliales y neuronales en el cerebro (Gong et al., 2006).

En el cerebro, el sistema endocannabinoide participa en la regulación de diversas funciones como: locomoción, ingesta de alimento, emoción, dolor y memoria (Busquets-Garcia et al., 2011; de Oliveira Alvares et al., 2010; Morrish, Hill, Riebe,

& Gorzalka, 2009; Svizenska et al., 2008). A este último respecto, se sabe que los cannabinoides por sí mismos pueden afectar el proceso de memoria en sus diferentes etapas (para una revisión véase Morena & Campolongo, 2014), y se ha propuesto que el sistema endocannabinoide y los glucocorticoides interactúan para mediar la respuesta al estrés y la memoria (Akirav, 2013; Atsak et al., 2012; Hill & McEwen, 2010). Por ejemplo, hay evidencia de que el sistema endocannabinoide participa en la regulación de la secreción de los glucocorticoides a través del eje HHA (Akirav, 2013; Hill & McEwen, 2010). Por otro lado, se ha reportado que un antagonista a receptores CB1 (AM251) administrado directamente en la BLA o el hipocampo bloquea el efecto facilitador de la administración sistémica de corticosterona o dexametasona (glucocorticoide sintético), respectivamente, sobre la consolidación de la memoria (Campolongo et al., 2009; de Oliveira Alvares et al., 2010). Sugiriendo que el sistema endocannabinoide es reclutado para llevar a cabo el efecto facilitador de los glucocorticoides sobre la memoria (Atsak et al., 2012; Campolongo et al., 2009).

2.4 Aspectos básicos sobre el estriado dorsal

El estriado o neoestriado forma parte del conjunto de núcleos subcorticales denominados núcleos de la base o ganglios basales, los cuales participan en la regulación de las funciones motoras y cognitivas (Afifi, 2003; Packard & Knowlton, 2002; Tortora & Derrickson, 2013). Los ganglios basales están integrados por el globo pálido (dividido en externo e interno), el putamen, el caudado y el núcleo accumbens. Funcionalmente, la sustancia negra (dividida en pars compacta y pars reticulada) y los núcleos subtalámicos están incluidos en este conjunto (Afifi, 2003;

Packard & Knowlton, 2002). El caudado y el putamen forman lo que se denomina como el estriado dorsal (ED). En ratas no se hace diferencia entre el putamen y el caudado, separado en primates por la capsula interna, y se considera como una sola estructura denominada caudado-putamen (Packard & Knowlton, 2002).

El ED es el principal receptor de aferencias a los ganglios basales (Afifi, 2003), éstas provienen de la corteza cerebral, sustancia negra pars compacta, y el tálamo a través de proyecciones glutamatérgicas, dopaminérgicas y glutamatérgicas, respectivamente. El principal blanco sináptico de estas proyecciones son las neuronas espinosas medianas (Bolam, Brown, Moss, & Magill, 2009).

Aproximadamente el 95 % de las neuronas del ED en rata (un porcentaje menor en primates), son neuronas de proyección del tipo espinosas medianas GABAérgicas (Afifi, 2003; Bolam et al., 2009). Las neuronas espinosas medianas proyectan sus axones hacia núcleos de salida de los ganglios basales a través de dos vías (directa e indirecta) y cuentan con extensos axones colaterales que proyectan hacia otras neuronas espinosas medianas (Afifi, 2003; Kreitzer & Malenka, 2008). La vía directa proyecta al globo pálido interno y la sustancia negra pars reticulada, que a su vez proyectan axones hacia el núcleo motor del tálamo. La vía indirecta proyecta hacia el globo pálido externo que a su vez proyecta a los núcleos subtalámicos y estos envían axones al globo pálido interno y a la sustancia negra pars reticular. Estas vías constituyen las principales eferencias del ED. El porcentaje restante de neuronas estriatales son interneuronas sin espinas grandes y pequeñas, colinérgicas y GABAérgicas respectivamente (Figura 5).

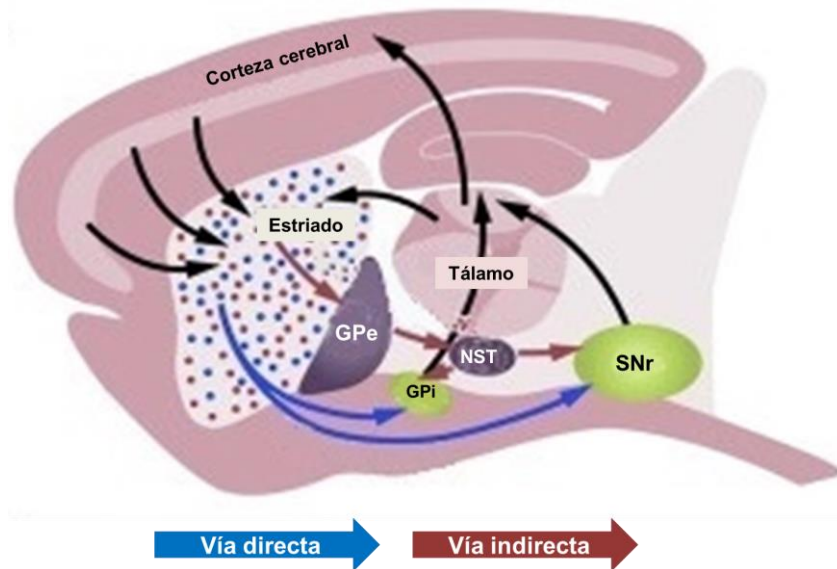


Figura 5. Vista sagital de un cerebro de ratón que representa el circuito de la corteza cerebral, los ganglios basales y el tálamo. La vía directa proyecta al globo pálido interno y la sustancia negra pars reticulada, que a su vez proyectan axones hacia el núcleo motor del tálamo. La vía indirecta proyecta hacia el globo pálido externo que a su vez proyecta a los núcleos subtalámicos y estos envían axones al globo pálido interno y a la sustancia negra pars reticular. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalámico; SNr: sustancia negra pars reticulada. Modificado de Kreitzer y Malenka (2008).

El ED, en conjunto con los ganglios basales, ha sido implicado en la ejecución de movimientos aprendidos y la preparación del movimiento. Las lesiones de los ganglios basales provocan temblor, rigidez muscular (espasticidad) y movimientos musculares involuntarios. Trastornos como éstos se observan en la enfermedad de Parkinson, afección en la cual las neuronas que van de la sustancia negra al putamen y al núcleo caudado se degeneran y causan esas alteraciones (Tortora & Derrickson, 2013). Asimismo, evidencia clínica y básica implican la participación de los ganglios basales en el proceso de memoria (para una revisión véase Packard & Knowlton, 2002). El ED es una estructura clave para la adquisición y la persistencia de memorias de tipo procedimental o implícitas (Eichenbaum, 2010;

Wingard & Packard, 2008). Además, expresa receptores a cannabinoides y a glucocorticoides (Herkenham et al., 1991; Morimoto et al., 1996; Van Waes et al., 2012), ambos, blancos de moléculas que han sido vinculadas a la regulación del proceso de memoria (McGaugh & Roozendaal, 2002; Morena & Campolongo, 2014). En ratas, la administración de corticosterona en el ED puede facilitar la consolidación de la memoria (Medina et al., 2007; Quirarte et al., 2009), y dicha facilitación puede involucrar a otras moléculas como al neurotransmisor acetilcolina (Sanchez-Resendis, Medina, Serafin, Prado-Alcala, Roozendaal, & Quirarte, 2012). Además, se ha reportado en estudios preliminares que los receptores CB1 en el ED participan en la consolidación de la memoria en una tarea de evitación inhibitoria (Sotelo Barrera, Siller Pérez, Serafín, Prado-Alcalá, & Quirarte, 2014). Sin embargo, no hay reportes que evalúen si los glucocorticoides pueden interactuar con los endocannabinoides en el ED, al igual que investigaciones previas donde se ha reportado esta interacción en otras estructuras cerebrales sobre la consolidación de la memoria (Campolongo et al., 2013; de Oliveira Alvares et al., 2010).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los glucocorticoides facilitan la consolidación de la memoria e interactúan con otras moléculas como los endocannabinoides en estructuras que participan en la formación de la memoria. Se sabe que el ED expresa receptores a cannabinoides y a glucocorticoides, sin embargo, no existen reportes que evalúen la interacción de estas moléculas en el ED y sus posibles efectos sobre la consolidación de una memoria aversiva.

3.1 Pregunta de investigación

¿Los glucocorticoides y el sistema endocannabinoide interactúan en el estriado dorsal para mediar la consolidación de una memoria aversiva?

4. HIPÓTESIS

H1. La administración bilateral del agonista cannabinoide WIN55,212-2 en el ED inmediatamente después del entrenamiento de evitación inhibitoria facilitará la consolidación de la memoria evaluada 48 horas después.

H2. La administración intraperitoneal del inhibidor de síntesis de glucocorticoides, metirapona, bloqueará el efecto facilitador de la administración bilateral de WIN55,212-2 en el ED inmediatamente después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria.

5. OBJETIVO

Describir el papel del sistema endocannabinoide y los glucocorticoides en el ED y en el proceso de consolidación de una memoria aversiva.

5.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la administración bilateral de diferentes dosis del agonista cannabinoide WIN55,212-2 en el ED inmediatamente después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria sobre la memoria evaluada 48 horas después.
- Evaluar si la inhibición de la síntesis de corticosterona (inducida por metirapona) bloquea el efecto facilitador del WIN55,212-2 sobre la memoria.

6. MATERIAL Y MÉTODO

Los protocolos experimentales de la presente tesis fueron aprobados para su realización por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM para el uso de animales experimentales y está acorde con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001) y las normas estipuladas en la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” de NIH (National Research Council, 2011).

6.1 Sujetos

Se emplearon 52 ratas macho de la cepa *Wistar* de entre 250 y 350 g, criadas en condiciones de bioterio. Se alojaron en cajas individuales con libre acceso a comida y agua, con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (inicio a las 07:00 hrs.). Se mantuvieron en estas condiciones durante todo el experimento. Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo durante la fase de luz, entre las 9:00 y 15:00 horas.

6.2 Cirugía para la implantación de cánulas

Previo al periodo experimental, las ratas se adaptaron al cuarto de alojamiento en el laboratorio por al menos siete días, posteriormente fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, intraperitoneal) y se les administró atropina (0.4 mg/kg, intraperitoneal) para mantener la respiración. El cráneo fue posicionado en un equipo estereotáxico (Stoelting, Co. IL) y dos cánulas guías de acero inoxidable (11 mm) fueron implantadas en forma bilateral en la porción anterior del ED de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (2005). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con un tornillo y cemento dental. Se insertó un estilete en cada cánula para evitar su permeabilidad y sólo fueron removidos para la inyección del fármaco. Después de la cirugía las ratas recibieron una inyección subcutánea de 1 ml de solución salina isotónica para evitar deshidratación y permanecieron en una incubadora hasta que se recuperaron de la anestesia, posteriormente fueron regresadas a sus cajas de alojamiento. Las ratas tuvieron un mínimo de siete días

de recuperación de la cirugía antes de ser entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria.

6.3 Tarea de evitación inhibitoria

La tarea de evitación inhibitoria (o de evitación pasiva) aprovecha la preferencia innata de los roedores por zonas oscuras y la aversión por zonas iluminadas. Así, una rata es colocada en un compartimiento iluminado, separado por una puerta deslizable de otro oscuro. Cuando la puerta es abierta, la rata cruza al compartimiento oscuro. Una vez que ha cruzado, se le administra un choque eléctrico en las patas. Después de un determinado intervalo de tiempo se repite el procedimiento y se puede observar que la rata no pasa de nuevo al compartimiento en el que se le aplicó el choque anteriormente. Esta conducta de inhibición implica que la rata almacenó en la memoria la experiencia aversiva.

6.3.1 Aparatos

Las ratas fueron entrenadas y probadas en un aparato de evitación inhibitoria, constituido por dos compartimentos diferentes del mismo tamaño (30 × 30 × 30 cm) y comunicados por una puerta deslizable. El compartimiento seguro o inicial está constituido de paredes y una tapa de acrílico color rojo, con un piso formado por barras de acero inoxidable e iluminado con un foco de luz de 10 watts. El compartimiento de castigo u oscuro consta de dos placas electrificables de acero en forma de “v”, tapa de acrílico color rojo, y no tiene iluminación. Con la ayuda de un sistema de programación electromecánica se permite la aplicación del choque eléctrico así como la medición de latencias (Figura 6).



Figura 6. Fotografía de la cámara de evitación inhibitoria.

6.3.2 Procedimiento

Entrenamiento y latencia de adquisición. Las ratas fueron colocadas una a la vez dentro del compartimento seguro y 10 segundos después la puerta corrediza se abrió. El tiempo que a la rata le tomó para entrar al compartimento de castigo fue registrado (latencia de adquisición). Una vez que las cuatro patas del animal estuvieron en el compartimento oscuro se cerró la puerta y se aplicó un choque eléctrico en las patas (0.45 mA/1 s) (Figura 7A). La rata se retiró del compartimento de castigo justo después de finalizado el choque eléctrico. Inmediatamente después del entrenamiento cada rata recibió el tratamiento farmacológico correspondiente y se regresó a su caja individual.

Prueba y latencia de retención. Cuarenta y ocho horas después del entrenamiento se llevó a cabo la prueba de retención. Se procedió con cada rata de la misma forma descrita en el entrenamiento con la excepción de que no se

aplicó choque eléctrico. La latencia para entrar al compartimento de castigo fue registrada (latencia de retención) El tiempo máximo que se esperó para que la rata entrará al compartimento de castigo con las cuatro patas fue de 600 segundos. Se considera que un mayor tiempo de latencia es un indicador de buena retención (Figura 7B).

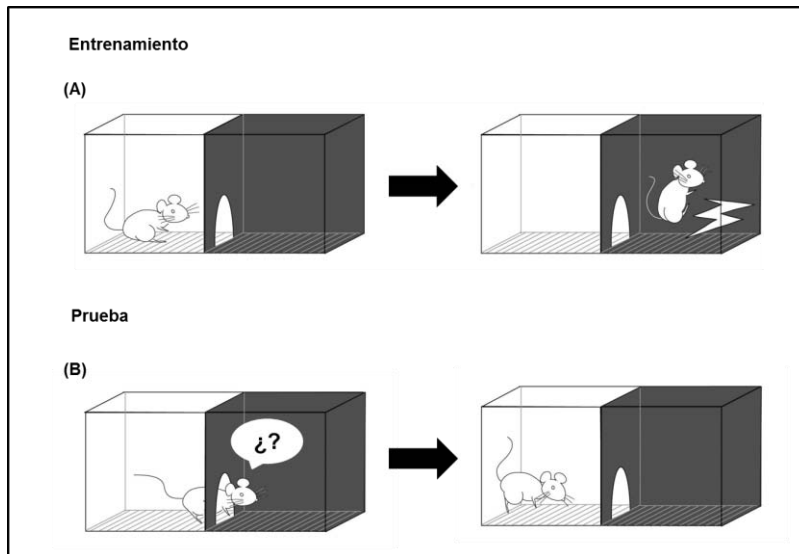


Figura 7 A y B. Representación esquemática de la tarea de evitación inhibitoria. A. Sesión de adquisición, la rata es colocada en el compartimento de seguridad, después de 10 segundos se le permite el acceso al compartimento de castigo en donde se le aplica un choque eléctrico en las patas. B. Sesión de retención, la rata es colocada nuevamente en el compartimento de seguridad y se le permite el acceso al compartimento de castigo, solo que esta vez no recibe choque eléctrico.

6.4 Administración de sustancias

6.4.1 Metirapona

Noventa minutos antes del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria se administró el inhibidor de la síntesis de glucocorticoides, metirapona (50 mg / Kg) o vehículo vía intraperitoneal (i.p.). La metirapona fue disuelta en polietilenglicol al

100 % y posteriormente diluida en solución salina al 0.9 % para alcanzar la concentración apropiada. La concentración final de polietilenglicol fue de 40 %. La solución vehículo tuvo la misma concentración de polietilenglicol.

6.4.2 WIN55,212-2

Inmediatamente después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria se administró el agonista cannabinoide, WIN55,212-2. Los estiletes fueron removidos de las cánulas guía y se insertaron agujas dentales, las agujas se conectaron a microjeringas Hamilton de 10 μ l mediante una tubería de polietileno. A cada rata se le inyectó un volumen de 1 μ l por hemisferio cerebral a una tasa de 1 μ l/min en el ED. Las agujas se mantuvieron un minuto adicional después de la inyección para permitir una mejor difusión del fármaco. La inyección de la solución utilizada como vehículo fue dimetil sulfóxido (DMSO al 10 %).

6.5 Diseño experimental

Las ratas fueron asignadas a uno los diferentes grupos independientes de forma aleatoria. El periodo experimental constó de seis días (Figura 8). En los días uno, dos y tres; las ratas fueron manipuladas por tres minutos cada día para adaptarlas al manejo experimental. En el día cuatro, las ratas fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria. Noventa minutos antes del entrenamiento se les administró metirapona o su vehículo (i.p.) e inmediatamente después del entrenamiento se les microinyectó bilateralmente WIN55,212-2 o su vehículo en el ED. De esta forma se constituyeron las diferentes configuraciones farmacológicas de cada grupo independiente (Tabla 1). En el día seis, 48 horas después del

entrenamiento, se realizó la prueba de retención. Las ratas permanecieron una hora en el área experimental antes y después de la manipulación, el entrenamiento y la prueba conductual para evitar condiciones de estrés que pudieran afectar la ejecución de la tarea, así como su consolidación.

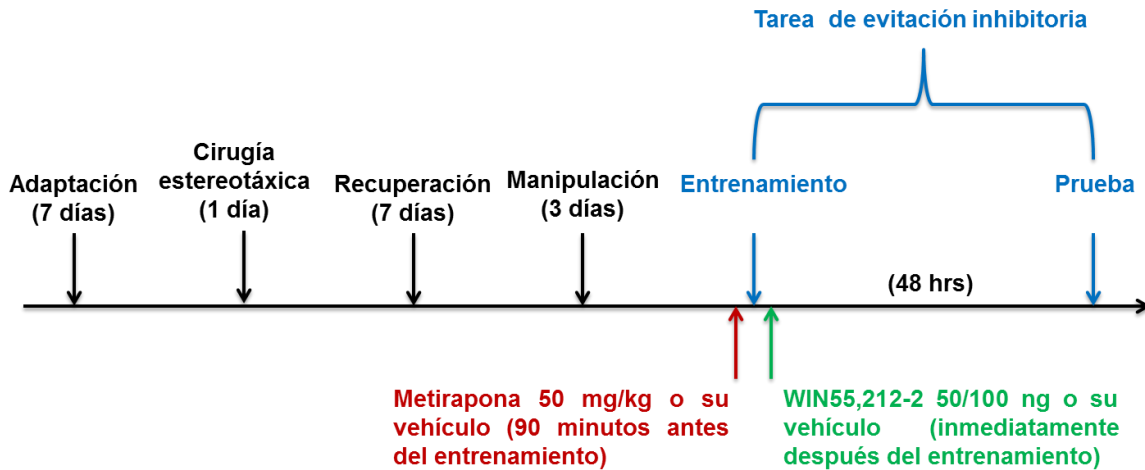


Figura 8. Diagrama de las actividades del periodo experimental.

6.5.1 Experimento 1

Para evaluar si la activación de los receptores CB1 en el ED contribuye a facilitar la consolidación de la memoria, se analizaron tres grupos independientes, a los que se les administró bilateralmente en el ED, WIN55,212-2 ya sea 50 o 100 ng / μ l o vehículo (DMSO al 10 %) inmediatamente después del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria. Cuarenta y ocho horas después se evaluó la retención de la memoria.

6.5.2 Experimento 2

Una vez determinada la dosis de WIN55,212-2 que causó un efecto facilitador en la consolidación de la memoria, se evaluó si la disminución en los niveles de corticosterona puede bloquear este efecto. A las ratas se les administró de forma intraperitoneal metirapona, inhibidor de la síntesis de corticosteroides, 90 minutos antes del entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria. Posteriormente, se administró bilateralmente WIN55,212-2 (100 ng / μ l por hemisferio cerebral) o vehículo (DMSO al 10 %) en el ED inmediatamente después del entrenamiento de la tarea. Cuarenta y ocho horas después de evaluó la retención de la memoria. Así, se compararon los grupos independientes de ratas con la configuración farmacológica de: a) vehículo+vehículo; b) vehículo+WIN100; c) metirapona+vehículo y d) metirapona+WIN100 (Tabla 1)

Tabla 1. Grupos experimentales.

Grupo	n	Metirapona (50 mg / Kg)	WIN55,212-2 (50 o 100 ng)
Vehículo+Vehículo	10	Vehículo	Vehículo
Vehículo+WIN50	10	Vehículo	WIN50
Vehículo+WIN100	9	Vehículo	WIN100
Metirapona+Vehículo	12	Metirapona	Vehículo
Metirapona+WIN100	11	Metirapona	WIN100

6.6 Verificación histológica

Al finalizar la prueba de retención de la tarea de evitación inhibitoria, las ratas fueron profundamente anestesiadas con pentobarbital sódico y perfundidas por vía intracardiaca. Posteriormente fueron decapitadas y los cerebros removidos y envasados en solución de formaldehído al 4% por al menos cinco días. Secciones de 50 μm fueron cortadas en un criostato y teñidas con la técnica de Nissl. Las secciones fueron examinadas bajo microscopio de luz para verificar la correcta localización de las cánulas (Figura 9).

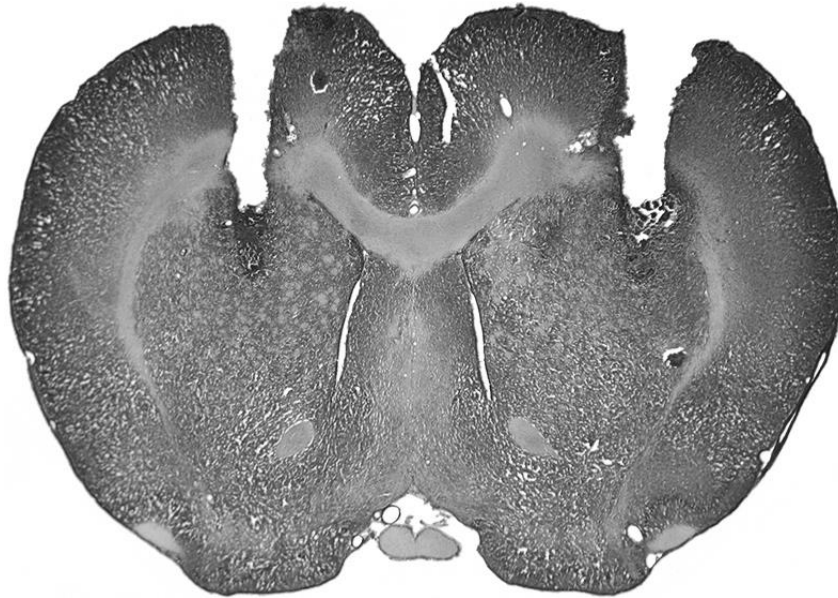


Figura 9. Fotografía de un corte coronal del cerebro de rata, teñido con la técnica de Nissl. Se muestran las cánulas bilaterales en el estriado anterodorsal. Fotografía tomada con un estereoscopio marca Leica MZ95 con 1.5 aumentos, acoplado a un sistema computarizado con el software Zoon Brower EX.

Los resultados obtenidos del análisis histológico al ubicar las puntas de las cánulas se muestran en la Figura 10. Los diagramas muestran cortes coronales

tomados del atlas de Paxinos y Watson (2005). Las coordenadas blanco del ED fueron: antero-posterior, +0.4 mm; mediolateral, ± 3.2 mm y dorsoventral -4.0 mm.

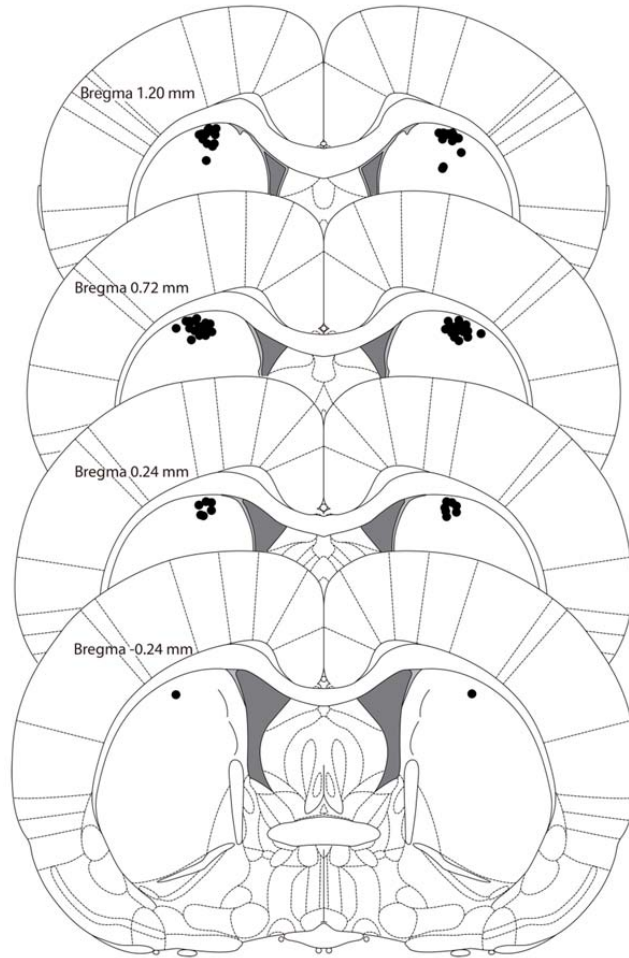


Figura 10. Representación esquemática de cortes coronales de rata en los que se observa la zona en donde se ubicaron bilateralmente las puntas de las cánulas en la región dorsal del estriado.

6.7 Análisis estadísticos y variables

En el análisis estadístico sólo se incluyeron los datos de las ratas que cumplieron con todos los siguientes criterios: contar con las puntas de las cánulas en la zona de interés, no haber tenido problemas durante la cirugía que pudiera comprometer

el desempeño en la tarea, contar con un implante quirúrgico en óptimas condiciones, haber mostrado respuesta conductual a la aplicación del choque eléctrico y no haber obtenido una latencia de entrada superior a 100 segundos.

La variable que se tomó en cuenta para evaluar los efectos de los tratamientos (variables independientes) sobre la memoria fue la latencia de retención (variable dependiente), que es el valor en segundos que durante la sesión de prueba tarda una rata en cruzar del compartimiento de inicio al compartimiento de choque.

Los datos de cada variable se analizaron con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$) mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la post hoc de U de Mann-Whitney.

7. RESULTADOS

En el entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria, las latencias de adquisición no difirieron significativamente entre de los grupos de ratas ($K = 5.558$; $P = 0.2347$). Cuarenta y ocho horas después del entrenamiento todos los grupos de ratas tuvieron latencias de retención significativamente mayores comparados con sus respectivas latencias de adquisición, por lo tanto las ratas retuvieron la experiencia del choque.

7.1 Experimento 1

Este experimento fue diseñado para investigar si la administración bilateral de WIN55,212-2 en el ED podía facilitar la consolidación de una memoria aversiva. La

prueba de la tarea de evitación inhibitoria se llevó a cabo 48 horas después del entrenamiento. Las latencias de retención difirieron significativamente entre los grupos de ratas (Kruskal-Wallis, $K=27.19$; $P=0.0001$). El grupo de vehículo+WIN100 tuvo una latencia de retención significativamente mayor (prueba U de Mann-Whitney) en comparación con los grupos vehículo+WIN50 ($H=10.50$; $P=0.0048$) y el grupo vehículo+vehículo ($H=37.00$; $P=0.0001$) (Figura 11).

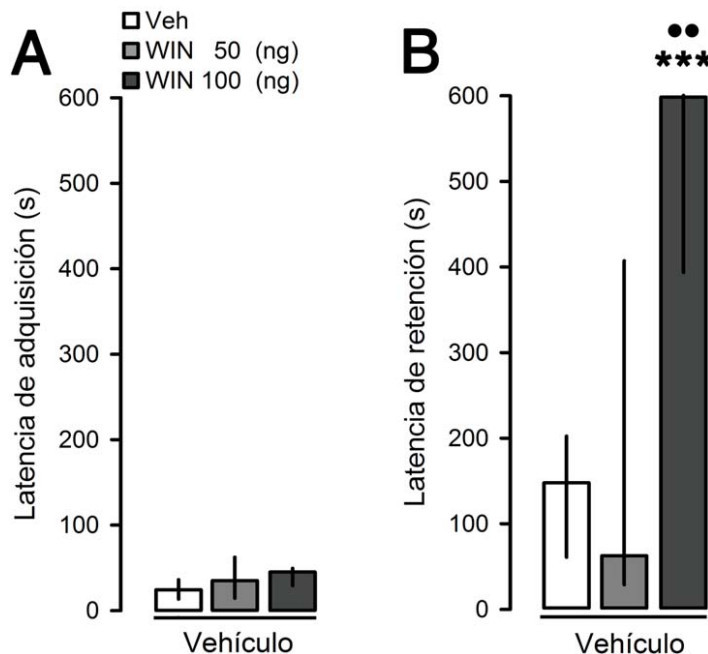


Figura 11. Experimento 1. A. Latencias de adquisición. No hubo diferencias significativas entre los grupos ($K= 5.558$; $P= 0.2347$). B. Latencias de retención. Los grupos difirieron significativamente ($K=27.19$; $P=0.0001$), el grupo vehículo+WIN100 tuvo una latencia de retención mayor en comparación con el grupo vehículo+vehículo (***) ($H=37.00$; $P=0.0001$) y el grupo vehículo+WIN50 (**) ($H=10.50$; $P=0.0048$).

7.2 Experimento 2

En este experimento se investigó si la administración intraperitoneal de metirapona puede bloquear el efecto facilitador del WIN55,212-2. La prueba de la tarea de

evitación inhibitoria se llevó a cabo 48 horas después del entrenamiento. Los grupos de ratas difirieron significativamente en sus latencias de retención (Kruskal-Wallis, $K=27.19$; $P=0.0001$). El grupo metirapona+vehículo tuvo una retención menor (prueba U de Mann-Whitney) comparado con el grupo vehículo+vehículo ($H=28.00$; $P=0.0378$) y el grupo vehículo+WIN100 ($H=1.000$; $P=0.0002$). Mientras que el grupo metirapona+WIN100 tuvo una retención menor en comparación con el grupo vehículo+WIN100 ($H=9.000$; $P=0.0022$) (Figura 12).

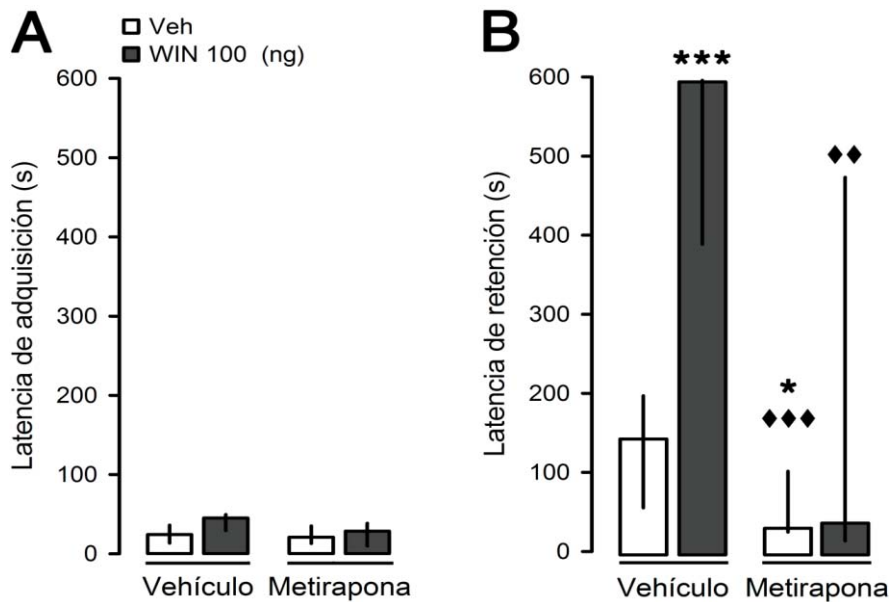


Figura 12. Experimento 2. A. Latencias de adquisición. No hubo diferencias significativas entre los grupos ($K= 5.558$; $P= 0.2347$). B. Latencias de retención. Los grupos difirieron significativamente ($K=27.19$; $P=0.0001$), el grupo metirapona+vehículo tuvo una latencia de retención menor en comparación con el grupo vehículo+vehículo (*) ($H=28.00$; $P=0.0378$) y el grupo vehículo+WIN100 (♦♦♦) ($H=1.000$; $P=0.0002$). El grupo metirapona+WIN100 tuvo una retención menor en comparación con el grupo vehículo+WIN100 (♦♦) ($H=9.000$; $P=0.0022$).

8. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue analizar la interacción de los glucocorticoides y los endocannabinoides sobre la consolidación de la memoria en el ED. Los resultados muestran que la administración bilateral de WIN55,212-2 en el ED puede facilitar la formación de la memoria, evaluada en la tarea de evitación inhibitoria, y la administración intraperitoneal de metirapona 90 minutos antes del entrenamiento bloquea este efecto. Adicionalmente, el efecto facilitador del WIN55,212-2 sobre la memoria presenta una curva dosis-respuesta, de forma similar a resultados de otros experimentos (Campolongo et al., 2009), ya que sólo la dosis de 100 ng de WIN55,212-2 tuvo un efecto facilitador y no así la dosis de 50 ng.

Los resultados del Experimento 1, como en trabajos previos (Campolongo et al., 2013; Campolongo et al., 2009; De Oliveira Alvares, Genro, Diehl, & Quillfeldt, 2008), sugieren que el sistema endocannabinoide contribuye a mediar el proceso de consolidación de memorias aversivas, y que el mecanismo de acción es al menos en parte mediado a través de la activación de receptores CB1. Aunque el WIN55,212-2 no es un agonista específico, dada la distribución del receptor CB1 (Herkenham et al., 1991) y su relación con procesos plásticos en el ED (Kreitzer & Malenka, 2008; Lovinger, 2010), es factible que el efecto facilitador observado este mediado principalmente a través de la activación de dichos receptores en el ED. Complementariamente, la administración bilateral en el ED del antagonista específico a receptores CB1, AM251, deteriora la formación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria (Sotelo Barrera et al., 2014). Sin embargo, el receptor

CB2 se ha reportado también en el estriado (Gong et al., 2006), por lo que una posible participación de éste no puede ser descartada del todo (Garcia-Gutierrez et al., 2013).

Los resultados del Experimento 2 muestran que la administración intraperitoneal de metirapona antes del entrenamiento bloquea el efecto facilitador del WIN55,212-2 sobre la formación memoria en la tarea de evitación inhibitoria, por lo que se sugiere que la concurrencia entre el sistema endocannabinoide y los glucocorticoides en el ED es necesaria para la consolidación de memorias aversivas. Esta idea es apoyada por trabajos previos que han sugerido una interacción entre los glucocorticoides y los endocannabinoides en la formación de la memoria (Campolongo et al., 2009; de Oliveira Alvares et al., 2005; Ramot & Akirav, 2012). Por ejemplo, se ha reportado que la respuesta del eje HHA puede modular el efecto del WIN55,212-2 sobre la memoria de corto y largo plazo (Campolongo et al., 2013); y que una experiencia emocional intensa es necesaria para involucrar la participación del sistema endocannabinoide en la consolidación de la memoria (de Oliveira Alvares et al., 2010).

Asimismo, como en trabajos previos (Loscertales et al., 1997; Roozendaal, Bohus, & McGaugh, 1996), la administración de metirapona 90 minutos antes del entrenamiento deterioró la retención una tarea. Sin embargo, es importante destacar, que aunque este grupo (metirapona-vehículo) tuvo una latencia de retención menor en comparación al grupo control, este difirió con respecto a su propia latencia de adquisición, por lo que retuvo la experiencia de la tarea y el efecto observado es probablemente debido a un deterioro en la y no a efectos

sobre la adquisición. Notablemente, la metirapona en conjunto con el WIN55,212-2 dio lugar a una retención similar a la del grupo control, sugiriendo que el WIN55,212-2 en el ED por sí mismo puede llevar a cabo parte de los mecanismos implicados en mediar la facilitación de la consolidación de una memoria aversiva.

Investigaciones respecto al papel de los endocannabinoides sobre la consolidación de la memoria han generado resultados mixtos (para una revisión véase (Morena & Campolongo, 2014). Por ejemplo, se ha reportado que agonistas cannabinoides como el WIN55,212-2 pueden facilitar la memoria (Campolongo et al., 2009) o deteriorar la memoria (Goodman & Packard, 2014). Investigaciones sugieren que la polarización de los resultados está relacionada con el perfil específico de estrés, y la subyacente secreción de glucocorticoides, que las condiciones experimentales de cada protocolo imprime en los sujetos (Campolongo et al., 2013; Campolongo et al., 2012; de Oliveira Alvares et al., 2005; de Oliveira Alvares et al., 2010). Observaciones previas apoyan esta idea, se ha reportado una relación bidireccional entre los glucocorticoides y los endocannabinoides en la regulación de la respuesta al estrés (Hill & McEwen, 2010). En este sentido, el presente trabajo es un ejemplo de cómo los niveles de glucocorticoides, subyacentes a la respuesta del eje HHA, son necesarios para determinar el efecto facilitador del WIN55,212-2 sobre la consolidación de la memoria en un tarea aversiva.

EL ED es una estructura que ha sido relacionada con tareas de tipo procedimental (Packard, 2009). La administración de corticosterona en el ED puede facilitar selectivamente la consolidación de la memoria de tareas este tipo (Quirarte et al.,

2009). Sin embargo, la administración de corticosterona también puede facilitar la consolidación de la memoria de tareas con elementos mixtos como es el caso de la tarea de evitación inhibitoria (Medina et al., 2007). Además, el estriado dorsal no es una estructura homogénea, esta puede dividirse en una porción medial y una porción lateral. A este respecto, la administración de corticosterona en la porción medial pueda facilitar la consolidación de memorias de tipo espacial (Lozano et al., 2013). Este resultado es consistente con las aferencias corticales de estas subregiones del estriado, ya que la parte lateral recibe aferencias de áreas de asociación mientras que la porción lateral recibe aferencias de áreas sensoriomotrices (Lovinger, 2010). En este contexto, el presente trabajo no distinguió entre estriado dorsomedial o estriado dorsolateral y la administración de WIN55,212-2 fue en la zona limítrofe entre ambas porciones, por lo que no es discernible si hubo un participación diferencial de alguna de las subregiones del ED o si el efecto facilitador es específico para un determinado tipo de memoria.

Para finalizar, reportes previos sugieren que los glucocorticoides y los endocannabinoides pueden convergir en estructuras cerebrales como el hipocampo y la BLA (Campolongo et al., 2009; de Oliveira Alvares et al., 2010). Los presentes resultados sugieren que una situación similar ocurre el en ED. Estas observaciones son consistentes con la distribución de los receptores CB1 y GRs en dichas estructuras (Morimoto et al., 1996; Tsou et al., 1998). Aunque el mecanismo neurobiológico subyacente a la relación endocannabinoides-glucocorticoides en la regulación del proceso mnémico aún no está dilucidado, se ha propuesto un modelo para el caso de la BLA (Campolongo et al., 2009; Hill &

McEwen, 2009). Brevemente, el modelo sugiere que la corticosterona liberada al torrente sanguíneo durante el entrenamiento de tareas que provocan excitación emocional, se unen a receptores GR en la membrana celular en la BLA y activan una cascada de señalización que estimula la síntesis de endocannabinoides. Una vez que los endocannabinoides son liberados al espacio sináptico, se acoplan a receptores CB1 en las terminales GABAérgicas e inhiben la liberación de GABA. La supresión de GABA subsecuentemente desinhibe la liberación de noradrenalina que resulta en una activación de β -adrenorreceptores postsinápticos y da paso a una cascada de señalización intracelular a través de quinasas como las de la familia de las MAP y las ERK que da como resultado una facilitación de la memoria a través de la fosforilación de elementos como CREB que promueve la expresión de genes y posteriormente de proteínas que participan en la consolidación de la memoria (Atsak et al., 2012; Campolongo et al., 2009). Se ha sugerido que un mecanismo similar podría tener lugar en el hipocampo (de Oliveira Alvares et al., 2010). Sin embargo, un modelo equivalente en el ED aún queda por ser descrito.

9. CONCLUSIONES

Los resultados muestran que la administración bilateral del agonista cannabinoide WIN55,212-2 facilita la consolidación de la memoria a través de la activación de los receptores CB1 en el ED. A la vez, este efecto es bloqueado por la administración intraperitoneal del inhibidor de síntesis de glucocorticoides, metirapona. En conjunto, los datos indican que la acción concurrente del WIN55,212-2 y los niveles intactos de glucocorticoides en el ED es necesaria para facilitar la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria. Por lo que se sugiere que en condiciones fisiológicas el sistema endocannabinoide y los glucocorticoides actúan en conjunto en estructuras como el ED para mediar la consolidación de memorias aversivas.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados de la presente tesis nos permiten proponer la realización de experimentos que nos brindarían más conocimiento acerca de los mecanismos de interacción entre los glucocorticoides y los cannabinoides para formar la memoria.

Algunas propuestas serían las siguientes:

1. Administrar tratamientos farmacológicos ya sea de agonistas o antagonistas como el WIN55,212-2 o el AM251 en las diferentes subregiones del ED (dorsomedial y dorsolateral).
2. Explorar la participación de los glucocorticoides y los cannabinoides en otros tipos de memoria utilizando tareas conductuales como el laberinto acuático de Morris en sus diferentes versiones (espacial y pista).
3. Investigar posibles interacciones de los endocannabinoides con otras moléculas como la acetilcolina, neurotransmisor que se ha demostrado interacciona con los glucocorticoides en la modulación de la facilitación de la memoria en el ED (Sanchez-Resendis et al., 2012).
4. Investigar una posible relación de los endocannabinoides y los glucocorticoides con el neurotransmisor GABA dado que aproximadamente el 95 % de las neuronas del ED en rata son neuronas GABAérgicas (Afifi, 2003; Bolam et al., 2009).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afifi, A. K. (2003). The basal ganglia: a neural network with more than motor function. *Seminars in Pediatric Neurology*, 10(1), 3-10.
- Akirav, I. (2013). Cannabinoids and glucocorticoids modulate emotional memory after stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(10 Pt 2), 2554-2563.
- Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D., Sandi, C., Venero, C., & Richter-Levin, G. (2004). A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learning & Memory*, 11(2), 188-195.
- Atsak, P., Roozendaal, B., & Campolongo, P. (2012). Role of the endocannabinoid system in regulating glucocorticoid effects on memory for emotional experiences. *Neuroscience*, 204, 104-116.
- Bolam, J. P., Brown, M. T. C., Moss, J., & Magill, P. J. (2009). Basal Ganglia: Internal Organization. En L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 97-104). Oxford: Academic Press.
- Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Pastor, A., de la Torre, R., Maldonado, R., & Ozaita, A. (2011). Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. *Biological Psychiatry*, 70(5), 479-486.
- Campolongo, P., Morena, M., Scaccianoce, S., Trezza, V., Chiarotti, F., Schelling, G., Roozendaal, B. (2013). Novelty-induced emotional arousal modulates cannabinoid effects on recognition memory and adrenocortical activity. *Neuropsychopharmacology*, 38(7), 1276-1286.
- Campolongo, P., Ratano, P., Manduca, A., Scattoni, M. L., Palmery, M., Trezza, V., & Cuomo, V. (2012). The endocannabinoid transport inhibitor AM404 differentially modulates recognition memory in rats depending on environmental aversiveness. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 11.
- Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Hauer, D., Schelling, G., McGaugh, J. L., & Cuomo, V. (2009). Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4888-4893.
- Coon, D. (2009). *Psicología* (10ª ed.) México: CENGAGE Learning.
- de Oliveira Alvares, L., de Oliveira, L. F., Camboim, C., Diehl, F., Genro, B. P., Lanziotti, V. B., & Quillfeldt, J. A. (2005). Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83(2), 119-124.
- de Oliveira Alvares, L., Engelke, D. S., Diehl, F., Scheffer-Teixeira, R., Haubrich, J., de Freitas Cassini, L., . . . Quillfeldt, J. A. (2010). Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. *Learning & Memory*, 17(4), 202-209.
- De Oliveira Alvares, L., Genro, B. P., Diehl, F., & Quillfeldt, J. A. (2008). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory

- consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 1-9.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51-86.
- Eichenbaum, H. (2010). Memory systems. En *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science* (pp. 478-490).
- Formiguera, X., & Sierra, A. (2007). Nuevos aspectos terapéuticos para el control de los factores de riesgo de la obesidad. *Medicina Clínica*, 128(13), 508-514.
- Fornari, R. V., Wichmann, R., Atucha, E., Desprez, T., Eggens-Meijer, E., & Roozendaal, B. (2012). Involvement of the insular cortex in regulating glucocorticoid effects on memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 10.
- García-Gutiérrez, M. S., Ortega-Alvaró, A., Busquets-García, A., Pérez-Ortiz, J. M., Caltana, L., Ricatti, M. J., . . . Manzanares, J. (2013). Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology*, 73, 388-396.
- Gong, J. P., Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Liu, Q. R., Tagliaferro, P. A., Brusco, A., & Uhl, G. R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Research*, 1071(1), 10-23.
- Goodman, J., & Packard, M. G. (2014). Peripheral and intra-dorsolateral striatum injections of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 impair consolidation of stimulus-response memory. *Neuroscience*, 274, 128-137.
- Guenzel, F. M., Wolf, O. T., & Schwabe, L. (2013). Stress disrupts response memory retrieval. *Psychoneuroendocrinology*, 38(8), 1460-1465.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., de Costa, B. R., & Richfield, E. K. (1991). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research*, 547(2), 267-274.
- Hill, M. N., & McEwen, B. S. (2009). Endocannabinoids: The silent partner of glucocorticoids in the synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4579-4580.
- Hill, M. N., & McEwen, B. S. (2010). Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 34(5), 791-797.
- Kandel, E. (2013). *Principles of Neural Science* (5ª ed.): McGraw-Hill Education.
- Kandel, E. R. (2007). *En busca de la memoria: el nacimiento de una nueva ciencia de la mente* (1ª ed.) Buenos Aires: Katz.
- Kolb, B., & Whishaw, I. Q. (2009). *Neuropsicología humana* (5ª ed.) España: Editorial Medica Panamericana.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543-554.
- Lau, T., & Schloss, P. (2008). The cannabinoid CB1 receptor is expressed on serotonergic and dopaminergic neurons. *European Journal of Pharmacology*, 578(2-3), 137-141.
- Loscertales, M., Rose, S. P. R., & Sandi, C. (1997). The corticosteroid synthesis inhibitors metyrapone and aminoglutethimide impair long-term memory for a passive avoidance task in day-old chicks. *Brain Research*, 769(2), 357-361.

- Lovinger, D. M. (2010). Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology*, 58(7), 951-961.
- Lozano, C., Gonzalez, E., Pena, A., Campos, M., Plaza, M. T., Rodriguez, M., . . . Tamayo, J. (2000). Response of parasitoids *Dendrosoter protuberans* and *Cheirpachus quadrum* to attractants of *Phloeotribus scarabaeoides* in an olfactometer. *Journal of Chemical Ecology*, 26(3), 791-799.
- Lozano, Y. R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2013). Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, 55-64.
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 205-210.
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory* 14(10), 673-677.
- Morena, M., & Campolongo, P. (2014). The endocannabinoid system: an emotional buffer in the modulation of memory function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 30-43.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., & Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research*, 26(3), 235-269.
- Morrish, A. C., Hill, M. N., Riebe, C. J., & Gorzalka, B. B. (2009). Protracted cannabinoid administration elicits antidepressant behavioral responses in rats: role of gender and noradrenergic transmission. *Physiology & Behavior*, 98(1-2), 118-124.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (pp. 65). México: SENASICA.
- Packard, M. G. (2009). Anxiety, cognition, and habit: A multiple memory systems perspective. *Brain Research*, 1293, 121-128.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563-593.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Portellano, J. (2005). *Introducción a la neuropsicología* (1ª ed.) Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Prado-Alcalá, R. A. (1991). Fisiología del aprendizaje y la memoria. En G. Ninomiya (Ed.), *Fisiología humana. I. Neurofisiología* (pp. 492-508). México: Manual Moderno.
- Quirarte, G. L., de la Teja, I. S., Casillas, M., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., & Roozendaal, B. (2009). Corticosterone infused into the dorsal striatum selectively enhances memory consolidation of cued water-maze training. *Learning & Memory* 16(10), 586-589.

- Ramot, A., & Akirav, I. (2012). Cannabinoid receptors activation and glucocorticoid receptors deactivation in the amygdala prevent the stress-induced enhancement of a negative learning experience. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(4), 393-401.
- Rians, D. (2003). *Principios de neuropsicología humana* (1ª ed.) México: McGraw-Hill Interamericana.
- Romano-Lopez, A., Mendez-Diaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., Carrisoza, R., & Prospero-Garcia, O. (2012). Maternal separation and proclivity for ethanol intake: a potential role of the endocannabinoid system in rats. *Neuroscience*, 223, 296-304.
- Rooszendaal, B. (2000). Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25(3), 213-238.
- Rooszendaal, B. (2002). Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 578-595.
- Rooszendaal, B., Bohus, B., & McGaugh, J. L. (1996). Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology*, 21(8), 681-693.
- Rooszendaal, B., Okuda, S., de Quervain, D. J.-F., & McGaugh, J. L. (2006). Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience*, 138(3), 901-910.
- Sanchez-Resendis, O., Medina, A. C., Serafin, N., Prado-Alcala, R. A., Rooszendaal, B., & Quirarte, G. L. (2012). Glucocorticoid-cholinergic interactions in the dorsal striatum in memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 33.
- Sotelo Barrera, E. L., Siller Pérez C., Serafin, N., Prado-Alcalá, R. A. y Quirarte, G. L. (2014). Participación de los endocannabinoides estriatales en la consolidación de una memoria aversiva. LVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Oaxaca, Oaxaca.
- Squire, L. R., & Wixted, J. T. (2011). The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 259-288.
- Svizenska, I., Dubovy, P., & Sulcova, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 90(4), 501-511.
- Takatsu-Coleman, A. L., Zanin, K. A., Patti, C. L., Zager, A., Lopes-Silva, L. B., Longo, B. M., Frussa-Filho, R. (2013). Short-term sleep deprivation reinstates memory retrieval in mice: the role of corticosterone secretion. *Psychoneuroendocrinology*, 38(10), 1967-1978.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología* (13ª ed.) México: Médica Panamericana.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2), 393-411.
- Van Waes, V., Beverley, J. A., Siman, H., Tseng, K. Y., & Steiner, H. (2012). CB1 Cannabinoid Receptor Expression in the Striatum: Association with

Corticostriatal Circuits and Developmental Regulation. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 21.

Wingard, J. C., & Packard, M. G. (2008). The amygdala and emotional modulation of competition between cognitive and habit memory. *Behavioural Brain Research*, 193(1), 126-131.