



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LOS ENDOCANNABINOIDES ESTRIATALES
EN LA CONSOLIDACIÓN DE UNA MEMORIA AVERSIVA**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA:
ERIKA LIS SOTELO BARRERA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. GINA LORENA QUIRARTE

Ensenada, B.C, junio 2015

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

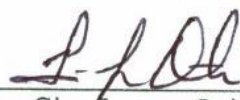
Votos aprobatorios del examen profesional de Biología

POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LOS ENDOCANNABINOIDES ESTRIATALES EN LA
CONSOLIDACIÓN
DE UNA MEMORIA AVERSIVA

Presenta:

Erika Lis Sotelo Barrera

Jurado calificador:



Dra Gina Lorena Quirarte
Presidente



Dra. Amelia Portillo López
Sinodal



Dr. Ulises III Pacheco Bardullas
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente tesis fue posible gracias a la ayuda y apoyo de las siguientes personas, unidades de apoyo y dependencias, a las cuales les expreso mis agradecimientos:

Agradezco al PAPIIT-DGAPA, UNAM IN202414 por el apoyo económico otorgado durante la realización de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas.

A mi tutora, la Dra. Gina Lorena Quirarte y al Dr. Roberto A. Prado Alcalá, por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria, B-04 del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

A los sinodales, Dra. Amelia Portillo y al Dr. Ulises Pacheco por sus aportaciones y apoyo en la revisión de la presente tesis.

A la M.V.Z. Norma Serafín López por la colaboración y el apoyo que me brindó para poder hacer este trabajo posible.

A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por sus consejos y asesoría en el uso de los diferentes equipos de laboratorio.

Al Sr. Ángel Méndez Olalde por el cuidado de las ratas con el que se logró que estuvieran en condiciones óptimas.

A todos mis compañeros del Laboratorio B04 de Aprendizaje y Memoria, en especial a la M. en C. Cristina Siller Pérez y a la M. en C. Viridiana Arenas Martínez.

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla:

M. en C. Leonor Casanova Rico. Enseñanza.

M.V.Z. Martín García Servín. Bioterio.

Lic. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón. Biblioteca.

Lic. Lourdes Lara Ayala. Videoconferencia.

Ing. Ramón Martínez, Ing. Omar González, Ing. Alberto Lara y Sandra Hernández. Cómputo.

Dra. Deisy Gasca Martínez. Análisis Conductual.

RESUMEN

La memoria es un proceso dinámico de almacenamiento y recuperación de la información aprendida. Para la formación del recuerdo de una experiencia aversiva se reclutan diferentes estructuras cerebrales, tales como la amígdala, el hipocampo y el estriado. A través de moléculas como los neurotransmisores, hormonas y neuromoduladores, la información permanece almacenada a largo plazo, mediante el proceso de consolidación. Se ha reportado que los glucocorticoides estriatales mejoran la retención de una tarea de evitación inhibitoria (EI). Otras moléculas que también participan en la consolidación de la memoria son los endocannabinoides; sin embargo, esto se conoce en pocas estructuras como la amígdala. El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio del efecto de un antagonista a los receptores cannabinoides CB1 del estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria del aprendizaje de EI. Ratas macho Wistar (250-350 g) fueron implantadas con cánulas bilaterales en el estriado anterodorsal. Se entrenaron con una intensidad de choque eléctrico de 0.6 mA durante 1 segundo en la tarea de EI. Se formaron grupos independientes de ratas que recibieron vehículo o el antagonista AM251 (0.28 ó 0.56 ng/ μ l) inmediatamente después de haber sido entrenados (n=7-15). Las pruebas de retención se realizaron 48 horas después del entrenamiento. Los resultados mostraron que en el estriado anterodorsal la dosis de 0.56 ng de AM251 deteriora la retención al compararse con el control que recibió vehículo ($p \leq 0.05$); mientras que los datos obtenidos con la dosis de 0.28 ng no fueron significativos. Los resultados sugieren que los endocannabinoides estriatales a través de los receptores CB1 participan en la consolidación de la memoria a largo plazo de la EI.

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Importancia del estudio de la memoria	7
2.2. Clasificación de la memoria	8
2.3. Estructuras involucradas en el proceso de memoria	11
2.4. Anatomía y funcionalidad del estriado	12
2.5. Los endocannabinoides	13
2.7. La relación de los endocannabinoides con el eje Hipotalámico- Hipofisiario-Adrenal	17
2.8. Los endocannabinoides y la consolidación de la memoria	22
4. OBJETIVOS	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5.1. Organismos experimentales	27
5.2. Cirugía estereotáxica	28
5.3. Manipulación.....	30
5.4. Fármacos.....	30
5.5. Microinyección	30
5.6. Evitación inhibitoria	31
5.7. Perfusión.....	32
5.8. Histología.....	33
5.9. Análisis de datos.....	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Histología.....	34
6.2. Sesión de entrenamiento	36
6.3. Sesión de prueba.....	36
7. DISCUSIÓN	38

1. INTRODUCCIÓN

La memoria se refiere al almacenamiento de la información que es adquirida por medio del aprendizaje; ambos procesos son de vital importancia en los animales, incluyendo al ser humano, ya que permite recolectar información sensorial, fonética, visual, olfativa, de importancia ecológica y reproductiva, por ejemplo la localización de alimentos, construcción de refugios, caminos dentro del rango hogareño, interacciones sociales con otros animales, reconocer sonidos de posibles presas o depredadores, comunicación con miembros de su misma especie, conductas de apareamiento, cuidado de crías, entre otras. La información adquirida durante experiencias con contenido emotivo tiende a almacenarse mejor que aquellas experiencias menos emotivas (Bradley, Greenwald, Petry and Lang 1992; McGaugh 2006), ya que esta información nueva podría ser crítica para la supervivencia.

La información es almacenada de manera sistemática en el cerebro, aunque esta actividad resulta de la interacción de muchos mecanismos de procesamiento distribuidos en varias regiones del cerebro (Kandel 2013). Las regiones principalmente involucradas con la memoria son la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala y el estriado, que se ha relacionado con la memoria de procedimiento que involucra los hábitos y las habilidades (Squire 2004).

El almacenamiento de información involucra cambios a nivel molecular, en los que se encuentran cambios plásticos neuronales, cambios en los

potenciales de acción y la liberación de neurotransmisores que se unen a receptores específicos de la neurona postsináptica que pueden activar diferentes cascadas de señalización. Para este proyecto el receptor de interés es el receptor de cannabinoides CB1, dicho receptor se encuentra principalmente en el sistema nervioso, mostrando una alta densidad en la región del estriado (Herkenham, Lynn, Little, Johnson, Melvin, de Costa and Rice 1990). Los cannabinoides endógenos o endocannabinoides, regulan negativamente el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA), permitiendo la facilitación de la habituación a encuentros repetidos con el mismo estresor (Atsak, Roozendaal and Campolongo 2012). Los estudios de Campolongo, Roozendaal, Trezza, Hauer, Schelling, McGaugh y Cuomo (2009) demostraron que el bloqueo de los receptores CB1 en la amígdala por medio de un antagonista (AM251) causa un deterioro en la memoria mientras que la infusión del agonista WIN55 212-2 mejoran la consolidación de memoria, dependiendo de la dosis administrada, de la misma manera se observaron deterioros en la memoria al someter a ratones "knockout" del receptor CB1 y ratones "wild type" a los que se les administró un antagonista de este receptor (Varvel and Lichtman 2002).

El objetivo de este trabajo es evaluar la participación de los receptores de endocannabinoides CB1, encontrados en el estriado, en la tarea de evitación inhibitoria.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del estudio de la memoria

El aprendizaje y la memoria son procesos ligados, con gran valor adaptativo en el reino animal, el aprendizaje produce modificaciones plásticas en el sistema nervioso que se ven reflejadas en la conducta, resultantes de la experiencia. La memoria es el almacenamiento de la información aprendida, aquellos individuos con una evocación más rápida y acertada tendrán una ventaja en la competencia por recursos tanto inter como intra específica al tener la capacidad de recordar rutas y localización de alimento y bebida, además de poseer ventajas en el apareamiento, ya que se conocen especies en las que el comportamiento aprendido de los adultos es esencial para el cortejo de las hembras, por ejemplo existen aves que necesitan recordar cantos complejos, arácnidos que atraen a las hembras mediante ciertos movimientos, etc. (Beecher and Burt 2004; Rypstra, Wieg, Walker and Persons 2003). Gracias al aprendizaje y la memoria es que existe la comunicación en diferentes animales, ya que es aprendida, recordada y transmitida a través de las generaciones, en el caso de algunos cetáceos como las orcas, las crías aprenden de sus madres y de los miembros adultos de su grupo matrilineal, conjuntos de sonidos con diferentes frecuencias y entonaciones que permiten comunicarse con otros miembros de su especie (Deecke, Ford and Spong 2000), otro ejemplo son las suricatas que emiten sonidos de alerta para avisar a los miembros de su colonia

la presencia de depredadores (Manser 2001), y en los humanos la comunicación verbal y escrita es esencial para distintas tareas de la vida diaria.

2.2. Clasificación de la memoria

Según el tiempo en que la nueva información es almacenada la memoria se clasifica en 3 tipos: memoria inmediata, la cual puede durar de milésimas de segundo a segundos, y es de modalidad sensorial (Purves 2004), memoria a corto plazo, que es el término utilizado cuando la información es retenida durante segundos a minutos y mantiene transitoriamente representaciones de conocimientos actuales relevantes (Kandel 2013), éste es un tipo de memoria lábil y susceptible a interrupciones y la memoria a largo plazo que es aquella que puede tener una duración de días hasta años. La consolidación es la transición de memoria de corto plazo a una de largo plazo (Fig.1).

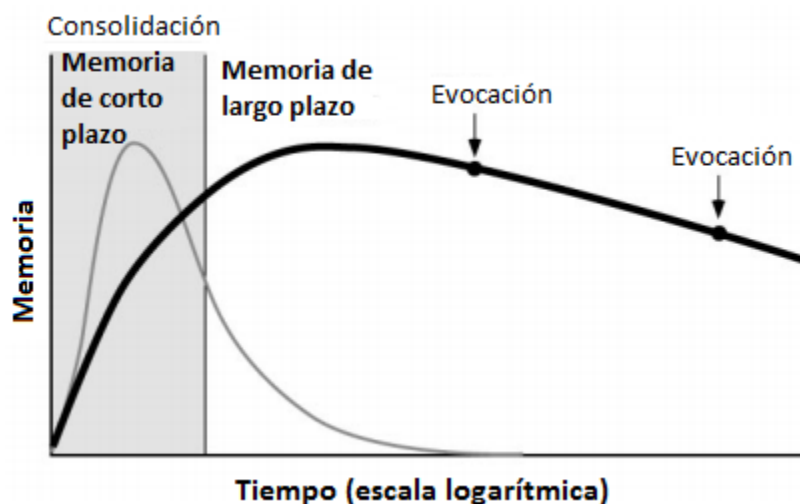


Figura 1. Modelo de la consolidación de la memoria. Modificado de Dudai (2004).

En humanos la memoria a largo plazo es clasificada en explícita o implícita (Tulving 1972). La memoria declarativa es un tipo de memoria explícita, almacena y recupera de forma consiente la información aprendida y puede ser expresada a través del lenguaje (Squire and Zola-Morgan 1988), ésta a su vez, se subdivide en dos tipos: memoria episódica, que se refiere al conocimiento de hechos y eventos en un contexto temporal y espacial (Kramer 2010) y en memoria semántica la cual almacena datos como palabras, conceptos y sus significados (Fig. 2).

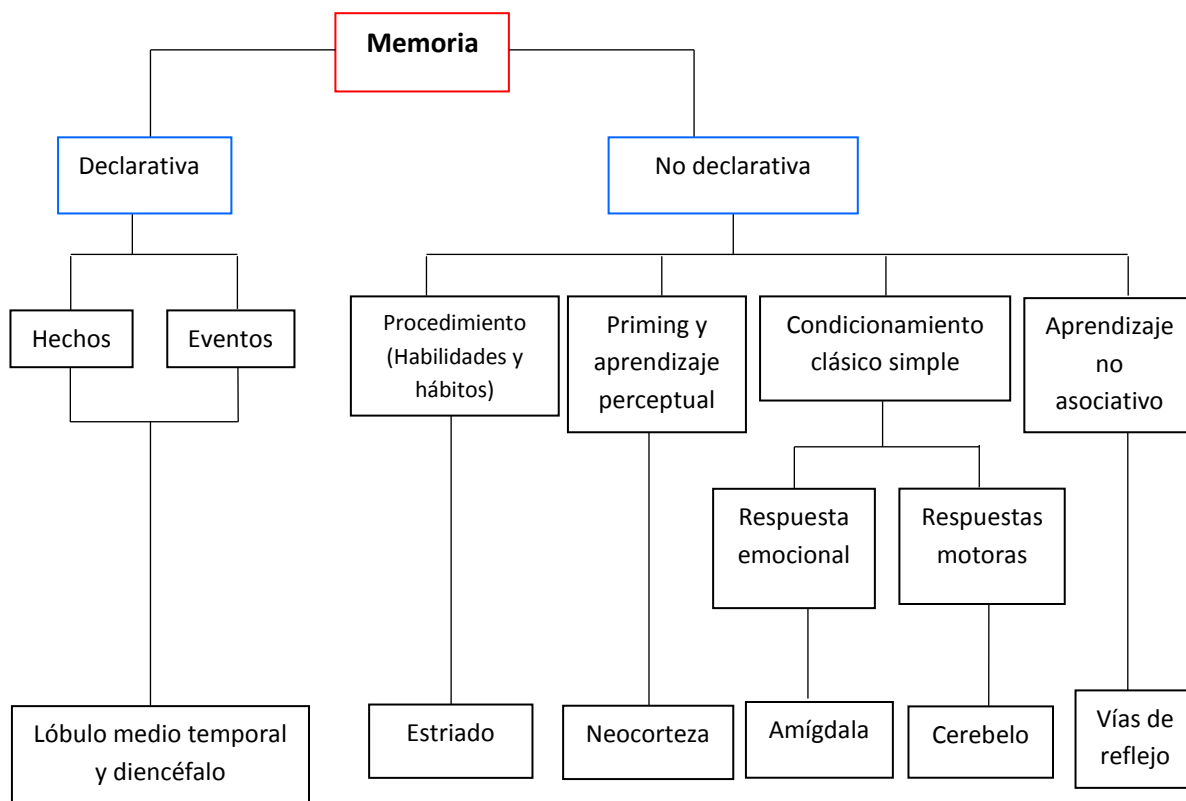


Figura 2. Taxonomía de los sistemas de memoria a largo plazo y las estructuras de especial importancia en estos sistemas. Modificado de Squire (2004).

La memoria no declarativa es una forma de memoria implícita, es la información que se almacena y recupera de forma automática, por ejemplo los hábitos y habilidades (Squire and Zola-Morgan 1988).

De manera homóloga a la memoria declarativa y no declarativa, la memoria de los roedores es clasificada en memoria espacial y en memoria de procedimiento, la primera se refiere a la representación espacial detallada de lugares previamente conocidos, mientras la memoria de procedimiento se refiere al almacén de información motora, habilidades, hábitos y condicionamiento (Kandel 2013).

Una tarea que ha sido empleada para el estudio de la memoria en roedores es la de evitación inhibitoria, cuyo método fue descrito por Slotnick y Jarvik (1966), en esta tarea están implicados los tipos de memoria espacial y de procedimiento, durante la tarea se utiliza la respuesta innata de los roedores de dirigirse hacia zonas oscuras o ftofobia, por lo que al ser colocados en una cámara iluminada se trasladarán hacia la cámara contigua que no está iluminada, al hacer esto se administra un choque eléctrico, cuya intensidad puede ser regulada, este evento aversivo tiene un componente emocional, si los roedores del estudio aprenden durante la sesión de prueba, se quedarán en el lado iluminado de la caja de evitación inhibitoria ya que asocian la descarga con la cámara oscura. En esta tarea se utiliza el condicionamiento clásico y el condicionamiento operante, donde el estímulo condicionado será la cámara

oscura y el estímulo no condicionado en el choque eléctrico por lo que el roedor tiene que inhibir la tendencia de cruzar hacia el lado oscuro.

Dependiendo el tiempo en que se haga la sesión de prueba se puede estudiar la memoria a corto plazo, la consolidación y la memoria de largo plazo.

2.3. Estructuras involucradas en el proceso de memoria

Distintas estructuras cerebrales están involucrados en diferentes tipos de memoria, y con los distintos procesos con los que la memoria está relacionada (aprendizaje, consolidación, evocación, extinción y recuperación espontánea) (Fig. 2).

El cerebelo juega un papel importante en la adquisición del aprendizaje motor de movimientos voluntarios y complejos, así como en el almacenamiento de movimientos previamente aprendidos (Haines 2002).

La corteza prefrontal está involucrada en la codificación, el almacenamiento y la evocación, en el procesamiento de información especialmente a corto plazo y en la memoria de procedimiento (Markowitsch 1995).

El hipocampo tiene una participación importante con la consolidación de la memoria de corto plazo a largo plazo, por ejemplo, cuando esta región se ve lesionada esta transición no se puede llevar a cabo (Haines 2002), además esta estructura también participa en la adquisición y recuperación de información

espacial, contextual y cognitiva (Izquierdo, Quillfeldt, Zanatta, Quevedo, Schaeffer, Schmitz and Medina 1997), así mismo el hipocampo es de especial importancia en las tareas que requieren asociar un estímulo individual con otros estímulos diferentes (White and McDonald 2002).

La amígdala procesa principalmente información emocional o aversiva (Izquierdo et al. 1997), como por ejemplo la asociación entre señales y reforzadores, aversión al sabor, condicionamiento de miedo y ansiedad. La región basolateral de la amígdala (BLA) proyecta a regiones corticales, como el hipocampo, el núcleo accumbens y el estriado, los cuales son cruciales en la consolidación de la memoria (McGaugh 2002). Tanto la amígdala como el hipocampo participan simultáneamente en etapas tempranas de la formación y recuperación de memoria (Izquierdo et al. 1997), de tareas que requieren información acerca de relaciones de estímulos-recompensa (McDonald and White 1993).

2.4. Anatomía y funcionalidad del estriado

El cuerpo estriado es una región anatómica que forma parte de los ganglios basales, está conformado por el caudado-putamen (estriado dorsal) y el núcleo accumbens (estriado ventral) (Gerfen 2004). En los seres humanos el caudado es una estructura con forma de C, que está separado del putamen por la cápsula interna, excepto en la parte frontal donde el caudado y el putamen son

continuos. El lóbulo medio temporal tiene conexiones anatómicas con el estriado, un rasgo característico de este complejo es la presencia de estriosomas, los cuales son regiones pobres en acetilcolinesterasa, además contienen grandes cantidades de neuropéptidos y diferentes tipos de receptores opioides; los estriosomas se encuentran dispersos en la matriz, la cual contiene cantidades elevadas de acetilcolinesterasa (Haines 2002). El estriado recibe proyecciones de diferentes regiones cerebrales, de las que destacan, la corteza prefrontal, la amígdala, los núcleos talámicos, la corteza entorrinal, el subículo, la región CA1 de la formación hipocámpal y la sustancia nigra compacta mesencefálica, todas estas estructuras están relacionadas con funciones cognitivas, motoras y de respuesta emocional (Finch 1996), por lo que no es de extrañar que este complejo esté involucrado en tareas cognitivas, de control motor, incluyendo la preparación y ejecución del movimiento, y el aprendizaje de secuencias motoras (Afifi and Bergman 2006; Albouy, Sterpenich, Baeteau, Vandewalle, Desseilles, Dang-Vu, Darsaud, Ruby, Luppi, Degueldre, Peigneux, Luxen and Maquet 2008), además, el estriado dorsal es importante en tareas de memoria que requieren un reforzamiento de la asociación estímulo- respuesta (McDonald and White 1993).

2.5. Los endocannabinoides

El cannabinoide Delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta-9-THC) es el principal ingrediente psicoactivo de *Cannabis sativa* (Joy, Watson Jr., and Benson Jr.,

1999), en la década de 1980 se identificó el receptor de cannabinoides CB1, el cual es un receptor acoplado a proteínas G, distribuido principalmente en el sistema nervioso central de humanos y roedores, también se encuentra en el hígado, pulmones y riñones, este tipo de receptores son expresados por terminales neuronales (Riebe and Wotjak 2011). CB2 es un receptor acoplado a proteínas G, encontrado predominantemente en la glía, además de ser expresado en tejidos y células del sistema inmune (Atsak et al. 2012).

En 1990, Herkenham y colaboradores utilizaron el método de autorradiografía para conocer la localización de los receptores de cannabinoides CB1 en el cerebro, las regiones donde encontraron mayor densidad fue en el cerebelo, hipotálamo, amígdala, globo pálido, sustancia nigra, giro dentado, corteza cerebral y el hipocampo. Específicamente en los ganglios basales se ha demostrado que estos receptores están localizados con gran densidad en las neuronas medianas espinosas eferentes del estriado dorsal (Fig. 3) (Herkenham, Lynn, de Costa and Richfield 1991; Moldrich and Wenger 2000).

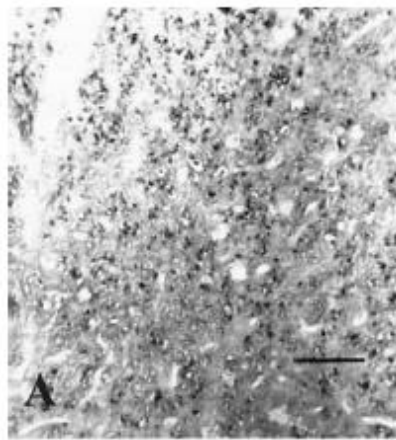


Figura 3. Inmunorreactividad del receptor CB1 en el estriado. Escala 50 μ m. Modificado de Moldrich y Wenger (2000)

Los receptores de cannabinoides son activados por tres clases principales de ligandos: cannabinoides vegetales producidos por las plantas de *Cannabis*, cannabinoides sintéticos, y los ligandos endógenos, conocidos como endocannabinoides, los dos mejor caracterizados son N-arachidonylethanolamida (anandamida, AEA) y 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Finn 2010).

2.6. Mecanismos de acción

Los endocannabinoides son producidos por hidrólisis enzimática de fosfolípidos que contienen ácido araquidónico, un proceso que es iniciado cuando un receptor acoplado a la proteína G es estimulado por la concentración elevada interna de Ca^{2+} , Una vez producidos, los endocannabinoides funcionan como

moduladores, la despolarización de células postsinápticas en las que se encuentran los receptores a cannabinoides, resulta en un incremento de la concentración Ca^{2+} intracelular, disparando la liberación de endocannabinoides, que pueden cruzar libremente la membrana lipídica para actuar de manera retrógrada en receptores CB1 presinápticos (Fig.4). La activación de los receptores CB1 reduce la liberación de GABA vía la inhibición rápida de entrada de Ca^{2+} a las terminales (Campolongo et al. 2009). Después de la liberación de endocannabinoides, son tomados por transportadores de membranas y son degradados por las enzimas amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) que degrada anandamida, y la monoacilglicerol lipasa que degrada 2-AG (Ueda 2002).

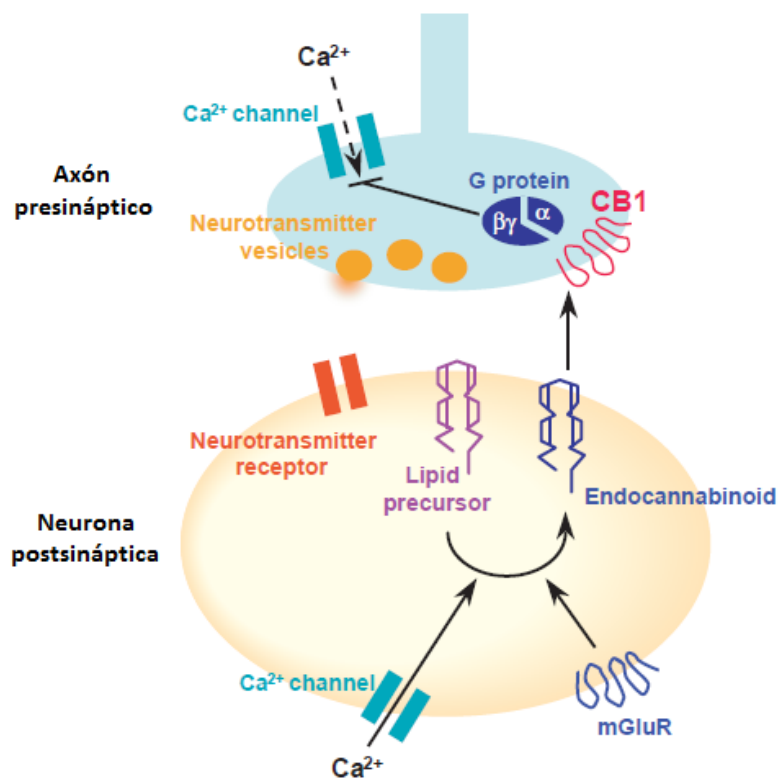


Figura 4. Señalización de los endocannabinoides de manera retrógrada. Modificado de Wilson y Nicoll (2002).

2.7. La relación de los endocannabinoides con el eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal

Un estresor es definido como un estímulo que tiene el potencial para causar cambios adversos en el organismo (Joëls and Baram 2009), mientras que el estrés es una condición compleja y dinámica que ocurre cuando la homeostasis de un organismo es perturbada o amenazada, y éste puede ser de carácter físico, psicológico o inmunológico (Finn 2010).

En la respuesta fisiológica al estrés se involucra la activación del eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal (HHA), la cual inicia con la liberación del Factor Liberador de Corticotropina (CRF) en las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). La CRF estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en la adenohipófisis, la cual a su vez induce la síntesis y liberación de glucocorticoides de la corteza adrenal (Fig. 5) (Hill, McLaughlin, Pan, Fitzgerald, Roberts, Lee, Karatsoreos, Mackie, Viau, Pickel, McEwen, Liu, Gorzalka and Hillard 2011).

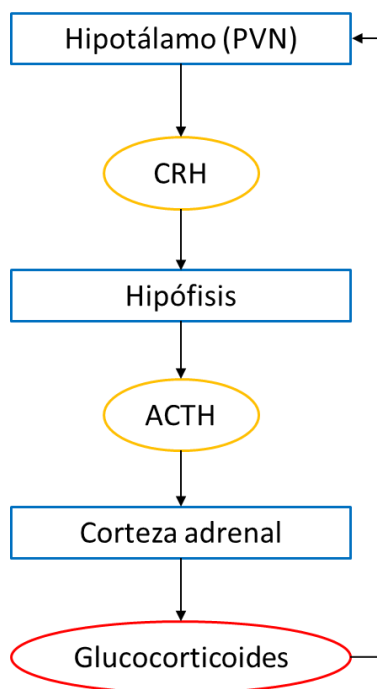


Figura 5. Eje Hipotalámico-Hipófisis-Adrenal

Después de la exposición a estresores, las hormonas glucocorticoides son liberadas, y se unen a receptores de membrana acoplados a la proteína G (mbGR) induciendo la síntesis de endocannabinoides. Los endocannabinoides AEA y 2-AG modulan el balance de excitación e inhibición a través de su habilidad para inhibir liberación sináptica de neurotransmisores mediante la activación de receptores CB1 presinápticos (Hill et al., 2011), al unirse a los receptores CB1 en la corteza media prefrontal (mPFC) en neuronas GABAérgicas, inhiben la liberación de este neurotransmisor, lo que a su vez, desinhibe la liberación de norepinefrina (NE) (Fig. 6) (Hill and McEwen 2009), en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Los endocannabinoides provocan la supresión rápida de la activación de células neurosecretoras de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), en el PVN del hipotálamo, además de actuar sobre las terminales presinápticas glutamatérgicas para inhibir la neurotransmisión excitatoria en las neuronas postsinápticas, reduciendo la excitación del eje HHA (Atsak et al. 2012; Di, Malcher-Lopes, Halmos and Tasker 2003; Evanson, Tasker, Hill, Hillard and Herman 2010) .

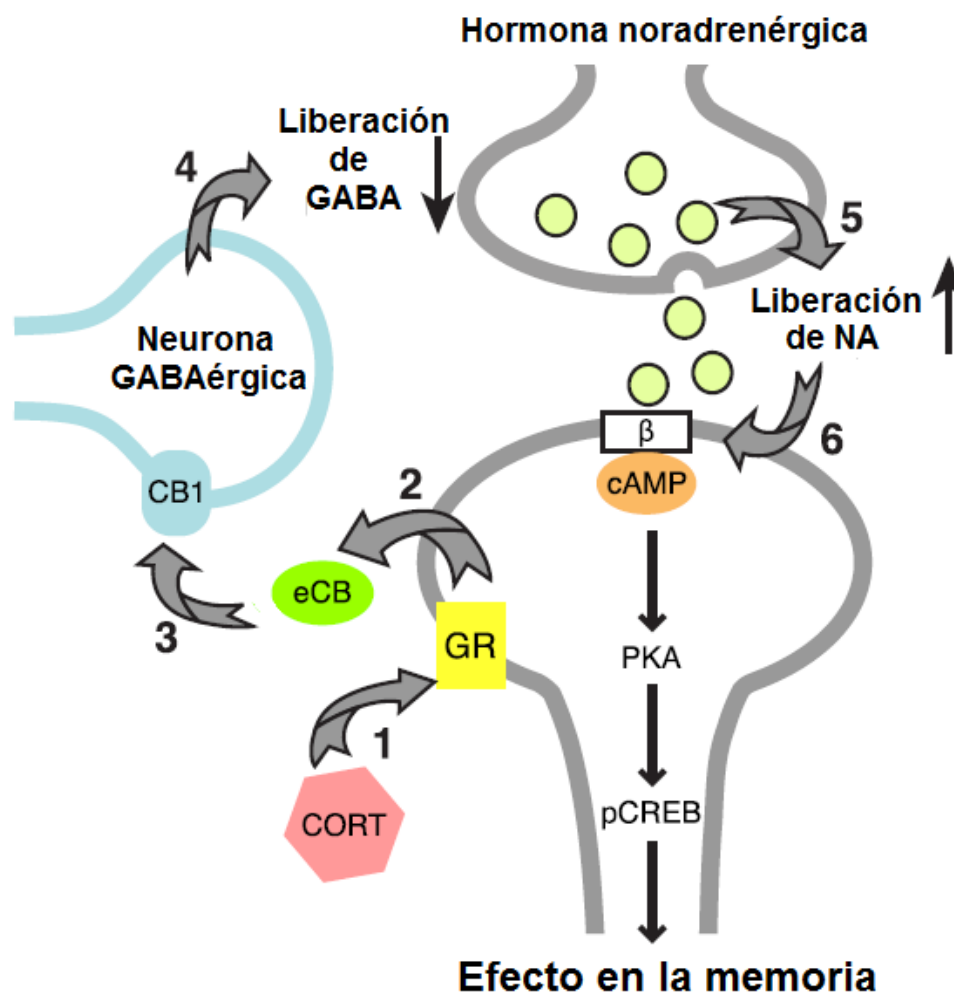


Figura 6. Papel del sistema de endocannabinoides en la modulación del efecto de los glucocorticoides sobre la consolidación de la memoria. Corticosterona (CORT), Receptor de glucocorticoides (GR), endocannabinoides (eCB), noradrenalina (NA). Modificado de Atsak y colaboradores (2012).

Tanto en roedores knockout sin el receptor CB1 como cuando se administra el antagonista de este receptor en la corteza media prefrontal se prolonga la elevación de niveles sistémicos de corticosterona inducidos por estrés. Cuando un grupo de ratas fueron expuestas a estrés los niveles del endocannabinoide 2-AG aumentaron en la mPFC pero al administrar el antagonista del receptor a

glucocorticoides RU-486 en esta región, se evitó que aumentaran los niveles de endocannabinoides (Hill et al. 2011).

Se ha reportado que el uso de concentraciones moderadas de glucocorticoides permiten mejorar la consolidación de la memoria de largo plazo de experiencias emocionales, sin embargo niveles más elevados de estas hormonas pueden afectar la evocación y la consolidación de la memoria en situaciones emocionales , Las dosis varían dependiendo de la forma de administración de corticosterona, al ser inyectada de forma sistémica en ratas se ha comprobado que las dosis entre 1.0 - 3.0 mg/kg tienen efectos facilitadores (Atsak et al. 2012), al ser inyectada al estriado la dosis de 10 ng (Medina, Charles, Espinoza-González, Sánchez-Resendis, Prado-Alcalá, Roozendaal and Quirarte 2007) y 1 µg en el hiperestriado ventral de los pollos (*Gallus domesticus*) (Sandi and Rose 1997). Cuando la corticosterona es administrada de forma sistémica, las dosis mayores a 3.0 mg/kg causan deterioro (de Quervain, Roozendaal and McGaugh 1998), mientras que cuando se adminsitra en el estriado de ratas este efecto es visto al utilizar 60 ng (Medina et al. 2007) y en el hiperestriado ventral del pollo es 5 µg (Sandi and Rose 1997).

Debido a los efectos de deterioro que altos niveles de glucocorticoides pueden tener en la memoria, es necesario que frene la secreción de estas hormonas y así prevenir los efectos negativos a los que conlleva (Hill et al.

2011). Los endocannabinoides regulan de manera negativa el eje HHA, facilitando la habituación de este eje ante situaciones de estrés homotípico repetido, de esta manera ayudan a mantener la homeostasis durante situaciones de estrés (Atsak et al. 2012).

2.8. Los endocannabinoides y la consolidación de la memoria

En experimentos con el uso del laberinto acuático de Morris se ha observado que en ratones a los que se les administra el antagonista del receptor CB1 SR-141716, al igual que los ratones "knockout" al receptor CB1, mostraron un deterioro en la memoria de trabajo (Varvel and Lichtman 2002). Otro estudio con ratones knockout al receptor CB1 en la tarea de reconocimiento de objetos llevado a cabo por Reibaud, Obinu, Ledent, Parmentier, Bohme e Imperato (1999) mostró que los animales lograron retener la memoria 48 h después del entrenamiento, en contraste los ratones silvestres (wild type) que perdieron la capacidad de retención después de 24 h, lo que sugiere que los endocannabinoides no participan en esta tarea ya que carece del componente emocional.

de Oliveira Alvares, de Oliveira, Camboim, Diehl, Genro, Lanziotti y Quillfeldt (2005) administraron el antagonista AM251 en la región CA1 del hipocampo de ratas, inmediatamente después de haber sido entrenadas en la tarea de habituación a un campo abierto, la cual es una tarea que carece de

componentes aversivos, los resultados mostraron que no se produjo ningún efecto en el proceso de memoria, sin embargo en tareas que si involucran componentes aversivos, el uso del antagonista AM251 en la misma región cerebral produjo deterioro en la consolidación de la memoria, de ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria (EI). Al inyectar AM251 en la amígdala basolateral (BLA) de ratas inmediatamente después de ser entrenadas en EI, también se observó un deterioro en la consolidación de la memoria (Campolongo et al. 2009), este efecto del antagonista del receptor CB1 en la memoria también ha sido encontrado en la tarea de miedo al contexto, donde las ratas a las que se les administró AM251 mostraron menor tiempo de congelamiento en comparación con el grupo control (Arenos, Musty and Bucci 2006).

Además de interferir con la consolidación de la memoria, el antagonista AM251 al ser inyectado en la BLA, bloquea los efectos facilitadores de la consolidación provocados por la inyección sistémica de corticosterona (Campolongo et al. 2009).

Los endocannabinoides participan en la memoria de tareas con componentes emotivos (Atsak et al. 2012) ya sea que la tarea involucre factores aversivos (Arenos et al. 2006; Campolongo et al. 2009; de Oliveira Alvares et al. 2005) o que involucren una recompensa, como ha sido comprobado por Rueda-Orozco y colaboradores (2008), quienes entrenaron ratas en la prueba del

laberinto T y les administraron el antagonista AM251 en el estriado, encontraron bloqueo en el proceso de extinción de la memoria, ya que necesitaron de 15 pruebas para aprender la nueva localización de la recompensa mientras el grupo control solo requirió de 5 pruebas.

Mientras los antagonistas del receptor CB1 provocan deterioro en la consolidación y extinción de la memoria (Arenos et al. 2006; Campolongo et al. 2009; de Oliveira Alvares et al. 2005; Rueda-Orozco et al. 2008) el uso del agonista WIN55 212-2 de este receptor facilita el proceso de consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria (Campolongo et al. 2009).

3. HIPÓTESIS

La administración del antagonista a endocannabinoides AM251 en el estriado anterodorsal de ratas, inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria provocará deterioro en la memoria.

4. OBJETIVOS

General

Evaluar la participación de los endocannabinoides estriatales en la consolidación de memoria.

Particular

Determinar la dosis efectiva de AM251, antagonista a receptores CB1, que administrada en el estriado deteriore la consolidación de la memoria.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Los protocolos experimentales que se emplearon en 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 a las normas estipuladas en la “Guide for the care and use of laboratory animals” (National Research Council 2011). En la Figura 6 se muestran todos los pasos del protocolo seguido.

5.1. Organismos experimentales

Se utilizaron 33 ratas macho adultos (*Rattus rattus*), de la cepa *Wistar* criadas en el bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM, campus Juriquilla, con un peso entre 250-300g. Los ratas, fueron transportados al bioterio del laboratorio de Aprendizaje y Memoria de dicha institución, fueron ambientados con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad (7:00 am-7:00 pm), a una temperatura de 22°C, se colocaron individualmente en cajas de acrílico transparente (policarbonato 50X40X20 cm), con lecho de aserrín, el cual fue cambiado 2 veces por semana. Se les proporcionó agua y comida *ad libitum*, se les dio una semana a las ratas para que se habituaran al nuevo ambiente.

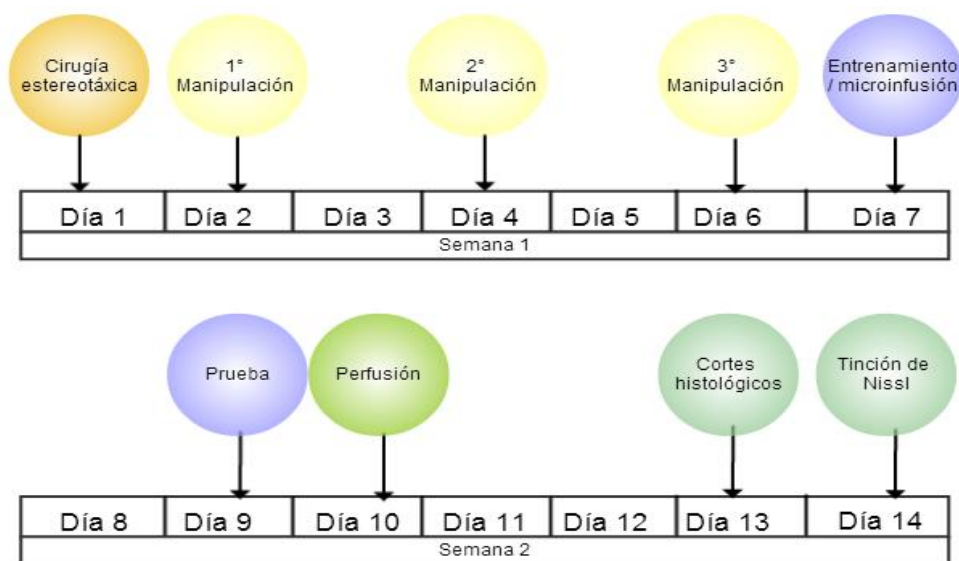


Figura 7. Pasos del protocolo al que se sometieron todas las ratas del proyecto.

5.2. Cirugía estereotáxica

Las ratas se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico con una dosis de 45 mg/kg, además se inyectó sulfato de atropina para controlar las secreciones mucosas y solución salina para prevenir la deshidratación, se rasuró la zona más anterior de la cabeza y se procedió a montarlas en el equipo estereotáxico, se utilizó xilocaína como anestésico local y con un bisturí se hizo una incisión para dejar expuesta la parte superior del cráneo. Se hicieron dos pequeñas aberturas con un taladro en la región del estriado anterior dorsal, en las siguientes coordenadas: Bregma= Antero-posterior +0.7, Medio-lateral izquierdo +3.2, derecho -3.2, Dorso-ventral -4.0, con base en un atlas del cerebro de la rata (Paxinos and Watson 2005). Se

implantaron bilateralmente cánulas de acero inoxidable de 11 mm (Fig. 8A), posterior a ello se realizó una perforación extra con el taladro en la parte posterior, para dar mayor soporte al cemento dental que mantenía unidas las cánulas al cráneo.

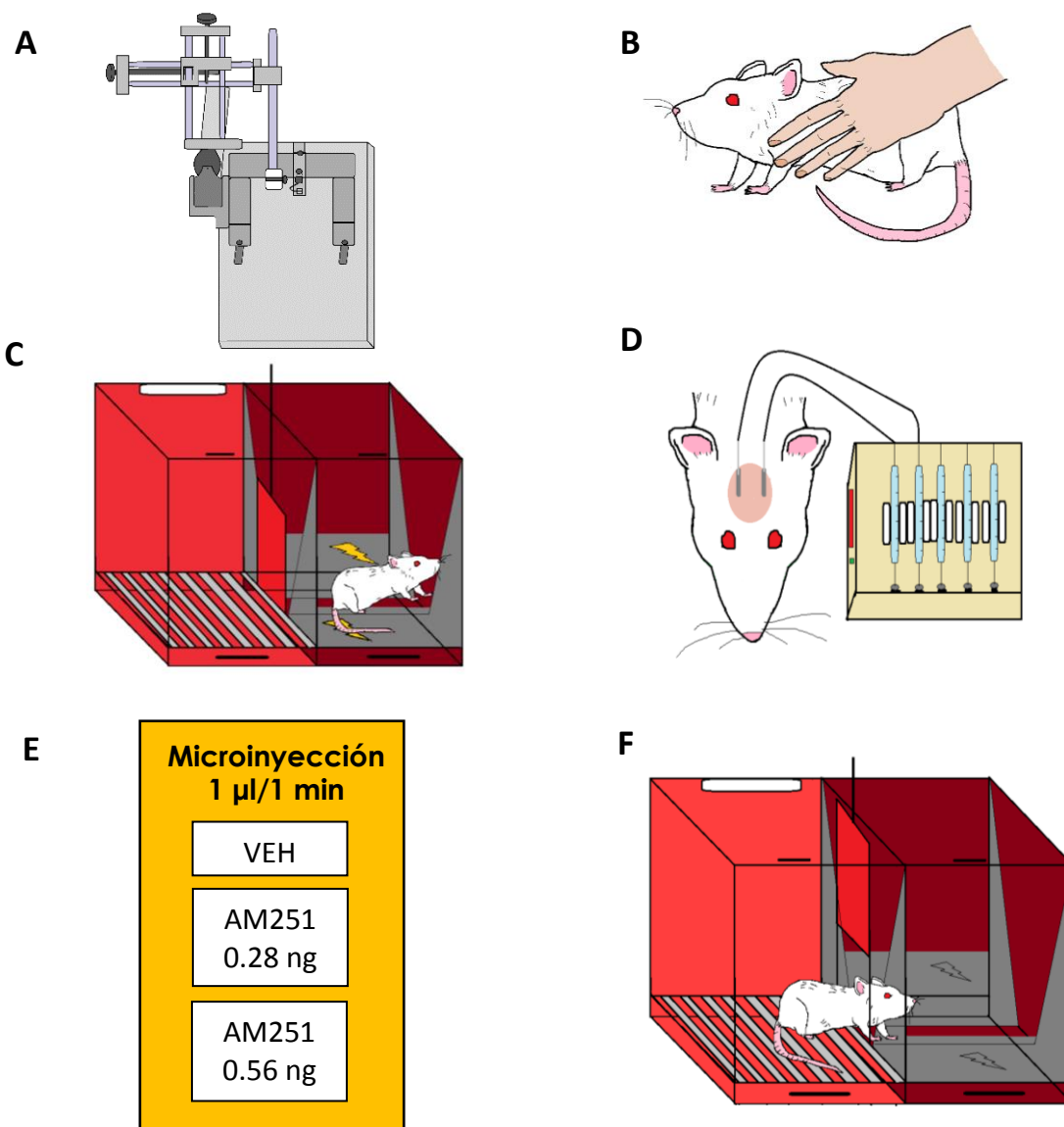


Figura 8. Diagrama que muestra la estrategia experimental. A. Estereotáxico, utilizado durante la cirugía para la implantación de las cánulas. B. Manipulación de las ratas. C. Entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. D. Administración del fármaco. E. Grupos experimentales. F. Prueba de retención en la tarea de evitación inhibitoria.

5.3. Manipulación

Una hora previa a la manipulación, las ratas fueron transportados a un estante, posteriormente se retiró a una de las ratas de su caja habitación y se acarició durante 5 minutos (Fig. 8B), fue pesada y se verificó que las cánulas estuvieran libres, después fue devuelta a su caja, esto se repitió con cada una de las ratas, las cuales permanecieron en el estante durante 1 hora antes de ser llevadas de vuelta al bioterio. Se realizaron un total de 3 sesiones de manipulación, cada tercer día. Durante la última manipulación se le colocó un falso inyector de 12 mm en ambas cánulas de cada rata, con la finalidad de que verificar que no estuvieran tapadas.

5.4. Fármacos

Se preparó el vehículo con Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % disuelto en 90% de solución salina (NaCl). Se prepararon 2 dosis con el antagonista de los receptores CB1, AM251, una dosis fue de 0.28 ng y la otra de 0.56 ng, disueltos en el vehículo (Fig. 8E). Los fármacos se prepararon antes de cada experimento y se administraron inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria.

5.5. Microinyección

Las ratas (n=36) se separaron aleatoriamente en 3 grupos, el Grupo 1 recibió vehículo (DMSO al 10% disuelto en solución salina) y tuvo la función de un grupo control, al Grupo 2 se le administró el antagonista AM251 (0.28 ng) y al Grupo 3 se le administró la dosis de a 0.56 ng de AM251. Se colocó un inyector

de 12 mm dentro de cada cánula, cada inyector estuvo conectado a una microjeringa Hamilton de 10 μ l a través de un tubo de polietileno de 30 cm aproximadamente. Se colocó la microjeringa en una bomba de infusión automática (WPI, sp220i) la cual administró el respectivo fármaco a una tasa de 1 μ l/ 1 min (Fig. 8D). Los inyectores permanecieron dentro de las cánulas durante 1 minuto adicional después de la infusión, lo que permitió una mejor difusión de los fármacos en el tejido.

5.6. Evitación inhibitoria

Para el entrenamiento de las ratas se utilizó una cámara de evitación inhibitoria (Fig. 8C), la cual se encuentra ubicada en un cuarto sonoamortiguado y oscuro, con dimensiones de 2.40 X 1.80 X 2.50 m, provisto de un enmascarador de ruido (San Diego Instruments, Inc.). Consiste en una caja con dimensiones 60 X 25 X 25 cm construida con acrílico rojo transparente, consta de 2 compartimentos de 30 X 30 cm cada uno, separados por una puerta deslizable, un compartimiento llamado "de seguridad" permanece iluminado con una lámpara de luz incandescente de 10 W en la parte superior, tiene una rejilla metálica en el piso con espacios de 16 mm, el otro compartimiento "de castigo" es oscuro, las paredes laterales son en forma de V, de acero inoxidable, las cuales llegan al piso del compartimiento y tienen una distancia entre ellas de 15 mm. Estas placas pueden ser electrificadas por un estimulador de corriente constante (Coulborn instruments, U.S.A).

Durante la sesión de entrenamiento se colocó a la rata en el compartimiento con luz, donde se dejó pasar 10 segundos para que explorara, posteriormente se abrió una puerta que permite el paso al otro compartimiento, inmediatamente después de que la rata entró al compartimiento oscuro (con las cuatro patas adentro) la puerta fue cerrada y la rata recibió un choque eléctrico en las patas durante 1 segundo, de 0.6 mA, dichos parámetros fueron elegidos de acuerdo a lo reportado por Campolongo y colaboradores (2009). Se registró la latencia de entrada al compartimiento oscuro. La duración de la aplicación de los estímulos, las latencias de entrada y de retención fueron medidas automáticamente con la ayuda de un cronómetro digital automático Schneider Electric S486. Las microinyecciones intracerebrales (MIC) se realizaron inmediatamente después del entrenamiento, después cada rata fue colocada en su caja habitación y permanecieron en un estante durante 1 hora antes de ser regresados al bioterio.

A las 48 horas después del entrenamiento se llevó a cabo la prueba de retención (Fig. 8F), la cual consistió en colocar a la rata en el compartimiento con luz y registrar la latencia para entrar al compartimiento oscuro, con una latencia máxima de 600 segundos. Durante la prueba no se aplicaron choques eléctricos a las ratas.

5.7. Perfusión

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (90 mg/kg) y se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina al 10% y

formaldehído al 4%, se removieron los cerebros y fueron conservados en formaldehído por al menos 72 h.

5.8. Histología

Se realizaron cortes histológicos del estriado para la verificación de la posición de las cánulas, los cortes se hicieron en un criostato a -22°C con un espesor de 50 μm , fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados, con una solución de gelatina-cromo (gernetina sin saborizante y alumbre de Cromo y Potasio) posteriormente fueron teñidos con la tinción de Nissl o violeta de cresilo, el exceso de colorante fue lavado con Xileno. Se revisaron los cortes histológicos en el microscopio óptico, los datos de aquellas ratas cuyas cánulas no se encontraban en el estriado anterior dorsal fueron descartados.

5.9. Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizaron los datos de la latencia de entrada y de la latencia de retención de aquellas ratas cuya posición de las cánulas en el estriado anterior fueron verificadas. Se realizaron las pruebas estadísticas no paramétricas de Kruskal-Wallis con una $p \leq 0.05$ para comparar las latencias de todos los grupos y la prueba U de Mann-Whitney con una $p \leq 0.05$ para comparar entre pares de grupos.

6. RESULTADOS

6.1. Histología

El análisis histológico se llevó a cabo observando los cortes del cerebro de las ratas bajo el microscopio para verificar que las cánulas estuvieran en el estriado anterodorsal (Fig. 9), se descartaron del análisis estadístico aquellas ratas cuyas cánulas no estaban en esta región. En la Figura 10 se muestra un esquema de la localización de las cánulas de aquellas ratas consideradas en el análisis estadístico. El número de ratas incluidas en el análisis fue: VEH (n=7), AM251 dosis de 0.28 ng (n=15) y AM251 dosis de 0.56 ng (n=11).



Figura 6. Corte coronal histológico del cerebro de rata con cánulas implantadas en el estriado anterior dorsal, teñido con la técnica de Nissl.

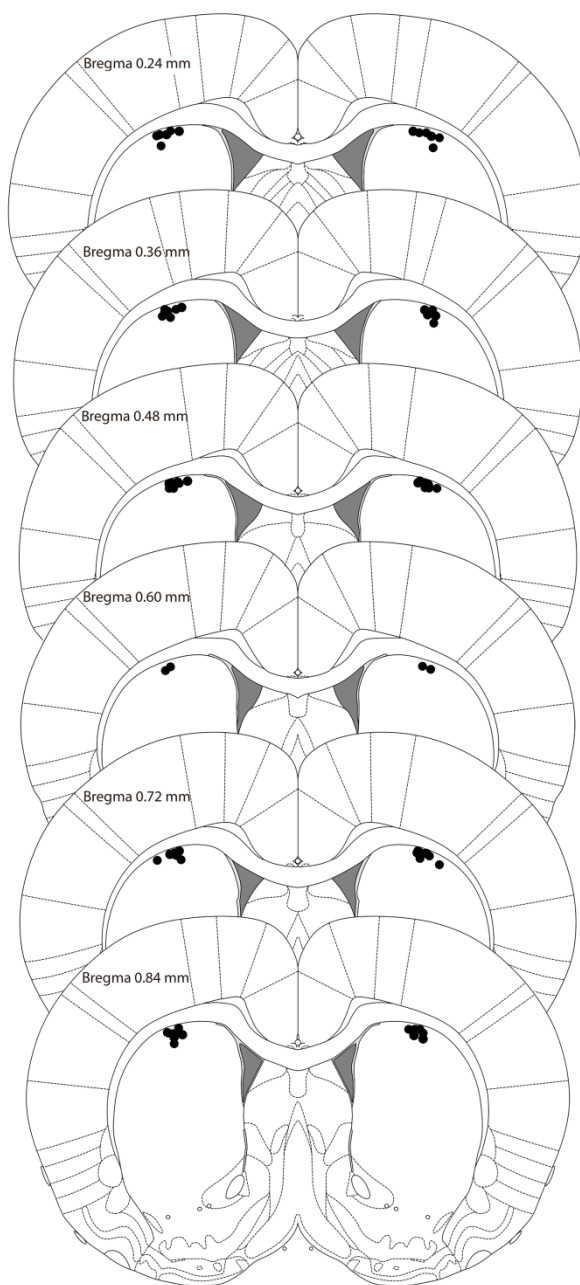


Figura 10. Esquemas que muestran la localización de las cánulas implantadas, en los cerebros de las ratas de los grupos Vehículo, AM251 0.28 ng y AM251 0.56 ng.

6.2. Sesión de entrenamiento

La mediana de las latencias de entrada obtenidas durante la sesión de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria de las ratas del grupo vehículo fue de 28.6 segundos, la del grupo AM251 0.28 ng fue de 32.38 segundos y la del grupo AM251 0.56 ng fue de 31.93 segundos (Fig. 11A).

El análisis de las latencias de entrada con la prueba de Kruskal-Wallis de los diferentes grupos, no mostró diferencias significativas ($H(2)=0.88$, $p=0.64$) entre los grupos vehículo ($n=7$), AM251 de 0.28 ng ($n=15$) y el grupo AM251 de 0.56 ng ($n=11$), lo que indica que las ratas se encontraban en las mismas condiciones motoras antes de la administración de los distintos fármacos.

6.3. Sesión de prueba

Las latencias de retención obtenidas durante la sesión de prueba en la tarea de evitación inhibitoria de las ratas pertenecientes al grupo vehículo mostraron una mediana de 526.5 segundos, el grupo AM251 0.28 ng presentó una mediana de 368.34 segundos y las ratas del grupo de AM251 0.56 ng tuvieron una mediana de 284 segundos (Fig.11B).

Las latencias de retención de los grupos fueron analizadas con la prueba de Kruskal-Wallis ($H(2)=8.14$, $p=0.017$). Al existir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, se realizó la prueba post hoc de U de Mann-Whitney, para comparar los diferentes grupos. Se encontró que no existieron

diferencias significativas entre el grupo vehículo y el grupo de AM251 con la dosis de 0.28 ng ($U=41.01$, $p=0.226$) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vehículo y el grupo de AM251 con la dosis de 0.56 ng con una ($U=16.0$, $p=0.022$).

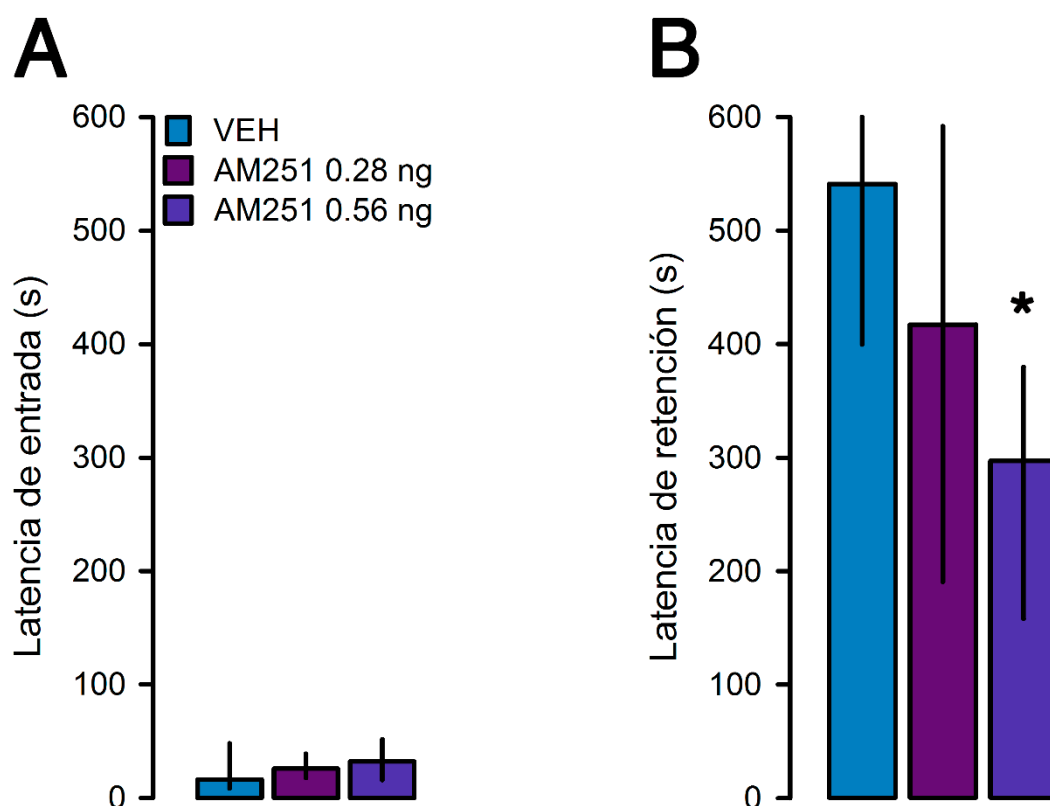


Figura 11. Representa las latencias de los grupos VEH ($n=7$), AM251 0.28 ($n=15$) y AM251 0.56 ($n=11$) en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestran las medianas con los rangos intercuartilares A. Latencia de entrada de las ratas al compartimiento oscuro en cámara de evitación inhibitoria. B. Latencia de retención de las ratas en la tarea de evitación inhibitoria. El asterisco (*) muestra diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo vehículo ≤ 0.05 .

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente tesis (Fig. 11B) mostraron que existieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo vehículo y el grupo que recibió 0.56 ng de AM251. Lo que indica que la administración de esta dosis en el estriado anterodorsal produce deterioro en la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria.

La consolidación de la memoria es el proceso que permite el paso de la memoria de corto plazo a memoria de largo plazo, se sabe que para que este cambio ocurra es necesaria la participación e interacción de diferentes hormonas y neuromoduladores en diversas estructuras cerebrales. Las estructuras más estudiadas por su participación en la formación de la memoria son: el hipocampo, que se asocia con el aprendizaje espacial, se sabe que al ser lesionado el proceso de consolidación se ve interrumpido (Haines 2002; Morris, Garrud, Rawlins and O'Keefe 1982), la amígdala, que actúa como un modulador de la consolidación de la memoria en situaciones emotivas, ya que la administración de fármacos o estímulos eléctricos en esta región puede mejorar o deteriorar este proceso (Campolongo et al. 2009; Gold, Hankins, Edwards, Chester and McGaugh 1975) y el estriado involucrado en la consolidación de la memoria de procedimiento, que es aquella información que se forma por la asociación de un estímulo con una respuesta, se refiere a las habilidades y hábitos (McDonald and White 1993).

Un paradigma conductual ampliamente utilizado en el estudio de la consolidación de la memoria espacial y de procedimiento en roedores es la evitación inhibitoria; es una tarea que utiliza como componente aversivo un choque eléctrico, la rata se coloca en un compartimento iluminado, las ratas presentan el comportamiento de fotofobia de manera innata, por lo que cruzarán hacia el compartimento oscuro donde recibirán un choque eléctrico, al volver a colocar a las ratas en esta cámara tendrán que evitar la conducta de dirigirse hacia el lugar más oscuro para impedir la aparición del estímulo aversivo. Esta tarea ha sido una herramienta útil para el estudio de la posible participación de distintas estructuras y fármacos, durante el desarrollo de la presente investigación la evitación inhibitoria fue útil para estudiar la participación de los endocannabinoides del estriado anterodorsal en la consolidación de la memoria.

Estudios previos han demostrado la participación de los endocannabinoides en la amígdala y el hipocampo, en la consolidación de la memoria de diversas tareas que involucran un componente emocional (Campolongo, Ratano, Manduca, Scattoni, Palmery, Trezza and Cuomo 2012; de Oliveira Alvares et al. 2005; Rueda-Orozco, Montes-Rodriguez, Soria-Gomez, Mendez-Diaz and Prospero-Garcia 2008).

En el presente estudio utilizamos AM251, el antagonista a los receptores CB1, trabajos previos con este fármaco demostraron deterioro en la

consolidación de la memoria en tareas con componentes aversivos como la evitación inhibitoria (Campolongo et al. 2009; de Oliveira Alvares et al. 2005), condicionamiento de miedo al contexto (Bucherelli, Baldi, Mariottini, Passani and Blandina 2006) o en tareas en las que la rata obtiene una recompensa como en el laberinto en T (Rueda-Orozco et al. 2008). Sin embargo en tareas que carecen de este componente emocional o de motivación como en la tarea de campo abierto no se encontraron diferencias entre el grupo control y los grupos a los que se les administró el antagonista AM251 (de Oliveira Alvares et al. 2005). Lo que sugiere que los endocannabinoides solo participan en la consolidación de la memoria de tareas que involucran componentes emotivos.

El resultado de este estudio es acorde con lo publicado en el 2005 por de Oliveira y colaboradores, en donde estudiaron el papel de los endocannabinoides en la consolidación de la memoria. Ratas macho adultos de la cepa Wistar fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria, donde el estímulo aversivo fue un choque eléctrico de 0.5 mA. Inmediatamente después del entrenamiento a un grupo de ratas se les inyectó el antagonista del receptor CB1, AM251 y a otro grupo vehículo, en el hipocampo dorsal. A las 48 horas se realizó la prueba de retención y se encontró que las latencias de retención de las ratas a las que se les administró el antagonista AM251 con la dosis de 5.5 ng fueron significativamente menores que las latencias registradas en el grupo vehículo. A otros grupos de ratas se les administraron dosis de AM251 de 0.5

ng y 55.5 ng, se encontró que no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo vehículo.

En otro estudio, Campolongo y colaboradores en 2009, entrenaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley en la tarea de evitación inhibitoria, con un choque eléctrico de 0.6 mA. Después del entrenamiento se administró AM251 en la amígdala basolateral, a las 48 horas se les realizó la prueba de retención, al comparar las latencias de retención encontraron que el grupo de ratas al que se le administró AM251 con la dosis de 0.28 ng presentó latencias significativamente menores con respecto al grupo control. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde el grupo de ratas Wistar que recibió la dosis de 0.56 ng de AM251 administrada en el estriado dorsal, inmediatamente después de entrenarse en la tarea de evitación inhibitoria mostró latencias de retención significativamente menores con respecto al grupo al que se le administró vehículo. En conjunto los datos obtenidos por diferentes grupos de investigación indican que los endocannabinoides del hipocampo, la amígdala y el estriado son necesarios para la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria, ya que el bloqueo de los receptores CB1 inmediatamente después del entrenamiento provoca deterioro en la retención de la tarea y es dependiente de la dosis utilizada.

Otra tarea con componente aversivo en la que se ha mostrado la participación de los endocannabinoides, es en el condicionamiento de miedo al contexto, que consiste en colocar a la rata en una caja que está conectada a un estimulador de corriente, durante la prueba la rata es colocada en este aparato pero esta vez sin choques eléctricos, posteriormente se registra el comportamiento de congelamiento (freezing) de la rata, que consiste en la ausencia de movimientos voluntarios, indicando que la rata asocia el contexto de la caja con los choques eléctricos por lo que se considera que aprendió la tarea. En el año 2006, Bucherelli y colaboradores estudiaron ratas macho Wistar que fueron condicionadas en la tarea de miedo al contexto, las ratas recibieron 7 choques eléctricos de 1 mA durante 1 segundo, inmediatamente después del entrenamiento fueron tratadas con AM251 (280 pg) administrado en la amígdala basolateral (BLA). El grupo de ratas al que se le administró el antagonista permaneció significativamente menos tiempo en “freezing” durante la prueba de retención en comparación con el grupo al que se le inyectó vehículo. Con lo que se demostró que el bloqueo de los receptores CB1 en la amígdala también deteriora el proceso de consolidación en esta tarea, que al igual que la evitación inhibitoria también tiene un componente emocional aversivo.

En todos los estudios mencionados previamente, en evitación inhibitoria y condicionamiento de miedo al contexto se utilizaron intensidades de choques eléctricos en el rango de 0.5-1 mA, en el experimento piloto de este trabajo se

utilizó la intensidad de 1 mA, el cuál fue un estímulo aversivo fuerte ya que tanto el grupo vehículo (n= 16) como al grupo al que se le administró AM251 de 0.28 ng (n=8) mostraron medianas de 600 segundos, que es la latencia de retención máxima en la tarea de evitación inhibitoria, es decir ambos grupos aprendieron la tarea. El uso de una intensidad muy baja (0.1-0.3 mA) podría no ser recordado por las ratas y un estímulo muy fuerte podría dificultar el proceso de extinción de la memoria, es por esto que es necesario el uso de un estímulo que sea suficiente para ser recordado, pero que a la vez permitiera observar el deterioro de la memoria, teniendo en cuenta esto se decidió disminuir la intensidad a 0.6 mA de acuerdo a lo reportado por Campolongo y colaboradores (2009).

La dosis de AM251 de 0.28 ng no causó efectos en la consolidación de la memoria y la dosis de 0.56 ng provocó un deterioro en la memoria, concordando con los resultados obtenidos en el estudio de los antagonistas de endocannabinoides en la memoria, las dosis bajas no producen efectos y las dosis más altas deterioran la memoria (Campolongo et al. 2009; de Oliveira Alvares et al. 2005; Rueda-Orozco et al. 2008). Esta diferencia de resultados puede deberse a que la dosis más baja falló al bloquear suficientes receptores CB1 en el estriado para evitar su unión con los cannabinoides endógenos.

Las tareas que se utilizan para estudiar la consolidación de la memoria emotiva no solo utilizan castigos que producirán una emoción aversiva como la

evitación o el miedo, también existen tareas que emplean recompensas como un componente que motivará al animal. Por su parte, Rueda-Orozco y colaboradores (2008) entrenaron ratas macho Wistar, en el laberinto T, donde se coloca comida azucarada como recompensa al final de uno de los brazos, la rata tiene que aprender a qué brazo girar para obtener la recompensa, posterior al entrenamiento a un grupo de ratas se les inyectó bilateralmente en el estriado dorsolateral, a otro grupo en el hipocampo, AM251 (3.2 μ L) y a un tercer grupo se les administró vehículo. Durante las pruebas ambos grupos con AM251 mostraron significativamente mayor número de respuestas incorrectas con respecto al grupo vehículo, indicando que el bloqueo de los receptores de eCB's en el hipocampo y el estriado deteriora la consolidación de esta tarea de forma similar al deterioro observado en estas estructuras con tareas aversivas (Bucherelli et al. 2006; Campolongo et al. 2009; de Oliveira Alvares et al. 2005). El contexto en el entrenamiento tiene influencia en los efectos de los endocannabinoides, estudios del agonista del receptor CB1 WIN han mostrado los efectos facilitadores de los endocannabinoides en la consolidación de la memoria (Campolongo, Morena, Scaccianoce, Trezza, Chiarotti, Schelling, Cuomo and Roozendaal 2013; Campolongo et al. 2009; Fuentes-Ibáñez 2015). Los efectos de los endocannabinoides dependen de las condiciones en las que se realice el experimento, Campolongo y colaboradores (2013) estudiaron dos grupos de ratas, un grupo fue manipulado y habituado a la caja de entrenamiento durante 7 días, con ausencia de objetos y el otro grupo no fue

manipulado ni habituado a la caja, es decir fue expuesto por primera vez a la caja en el entrenamiento de esta tarea cuando ya se habían colocado los objetos. Después del entrenamiento se inyectó WIN a las ratas de ambos grupos, a las 24 hrs se realizó la prueba de retención, los resultados mostraron que el grupo de ratas no habituadas presentaron efectos facilitadores de la memoria mientras que el grupo habituado no presentó estos efectos.

En las tareas sin el componente emocional no se ha observado la participación de los endocannabinoides. de Oliveira Alvares y colaboradores (2005), entrenaron ratas macho Wistar en la tarea de habituación de campo abierto, este consiste en una caja de 50 cm, donde el entrenamiento la rata es colocada por 3 minutos, se cuantifica el número de cruces y el movimiento entre los sectores, así como el tiempo que pasa en medio de la caja, inmediatamente después del entrenamiento, a un grupo de ratas se le administró vehículo, y a los otros 3 grupos se les administró AM251 con diferentes dosis 0.55 ng, 5.5 ng y 55 ng, las inyecciones fueron bilateralmente en el hipocampo dorsal y a las 24 h se realizó la prueba, se consideró que el animal aprendió y se habituó al campo si en la segunda sesión pasó menos tiempo explorando y moviéndose entre los sectores, si la rata no aprendió tuvo un comportamiento similar al que tuvo en la primera exposición al campo. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre el vehículo y las diferentes dosis de AM251, a pesar de que este equipo de trabajo había encontrado deterioro con la dosis de 5.5 ng en la tarea de evitación inhibitoria (de Oliveira Alvares et al. 2005), por lo

que dedujeron que los endocannabinoides no participan en la consolidación de esta tarea cuya característica principal es no tener un componente emocional.

Un modelo de la posible explicación de los efectos de los endocannabinoides en el proceso de la consolidación de la memoria fue propuesta por Hill y McEwen (2009) quienes sugieren que la participación de los endocannabinoides en la consolidación de la memoria en tareas emotivas, puede deberse a la interacción de estos neuromoduladores con las hormonas glucocorticoides y noradrenalina. Ante la exposición a un estresor se libera el Factor Liberador de Corticotropina, que da inicio a la cascada de señalización del eje HHA, esto conlleva a la síntesis y liberación de glucocorticoides (Guyton and Hall 2011), a su vez los glucocorticoides inducen la síntesis de los cannabinoides endógenos, los cuáles se unen a receptores CB1 presinápticos. Cuando los endocannabinoides se unen a receptores en células glutamatérgicas inhiben la liberación de glutamato y si se unen a terminales GABAérgicas inhiben la liberación de GABA (Auclair, Otani, Soubrie and Crepel 2000; Wilson, Kunos and Nicoll 2001), ambos neurotransmisores son inhibidores de noradrenalina, por lo que al reducir la liberación de estos, aumenta la actividad noradrenérgica, facilitando la consolidación de la memoria de experiencias emocionales (Atsak et al. 2012).

Ha sido ampliamente reportada la participación de los glucocorticoides y de la noradrenalina en la facilitación de la consolidación de la memoria (Medina et

al. 2007; Roozendaal 2000; Sanchez-Resendis, Medina, Serafin, Prado-Alcalá, Roozendaal and Quirarte 2012) sin embargo no se observan los efectos facilitadores de los glucocorticoides al administrarse CORT de manera sistémica y el antagonista AM251 en la amígdala basolateral (Campolongo et al. 2009), esta misma situación podría estar ocurriendo en el estriado, ya que se han observado efectos facilitadores de CORT en la tarea de evitación inhibitoria cuando se administra en el estriado. En ratas que fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria (0.45 mA) a las que se les administró CORT 3 mg/kg de manera sistémica mostraron una mejora en la retención, pero en aquellas que además de la CORT se les inyectó AM251 en el estriado anterodorsal con la dosis de 0.56 ng/ μ l, no presentaron el efecto facilitador de la memoria (Siller Pérez, Serafín, Campolongo, Prado-Alcalá, Roozendaal and Quirarte 2014).

Por primera vez se estudió la posible participación de los endocannabinoides estriatales en la consolidación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria, los experimentos de este trabajo sugieren que los receptores a endocannabinoides del estriado participan en la consolidación de la memoria en una tarea aversiva, ya que el bloqueo de los receptores CB1 tiene un efecto de deterioro en este proceso. Los endocannabinoides estriatales al igual que los hipocampales y amigdalinos son reclutados en respuesta a niveles elevados de glucocorticoides, que son liberados en respuesta a estrés, los endocannabinoides disminuyen los niveles de estas hormonas, ayudando a mantener un balance homeostático, esto tiene especial importancia ya que los

efectos facilitadores de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria tienen una relación dosis dependiente con forma de U invertida, por lo que el sistema endocannabinoide al modular la liberación de glucocorticoides participa en la modulación del estrés. La interacción de los endocannabinoides con los glucocorticoides y con la norepinefrina en el proceso de la consolidación de experiencias emocionales es importante, ya que en la naturaleza es necesaria una respuesta emocional adecuada ante situaciones aversivas para el éxito y supervivencia de un organismo, niveles elevados de estrés podrían interferir con los procesos cognitivos y/o con la capacidad para reaccionar apropiadamente ante una situación de peligro, por lo que los efectos moduladores del estrés y facilitadores de la memoria de los endocannabinoides son procesos indispensables de investigar.

8. CONCLUSIÓN

El presente trabajo demuestra que los receptores a endocannabinoides del tipo CB1 estriatales participan en la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria.

9. REFERENCIAS

- Afifi, A. K. and Bergman, R. A., 2006. *Neuroanatomía funcional: Texto y atlas*, 2da edn. McGraw-Hill.
- Albouy, G., Sterpenich, V., Balteau, E., Vandewalle, G., Desseilles, M., Dang-Vu, T., Darsaud, A., Ruby, P., Luppi, P. H., Degueldre, C., Peigneux, P., Luxen, A. and Maquet, P., 2008. Both the hippocampus and striatum are involved in consolidation of motor sequence memory. *Neuron* 58, 261-272.
- Arenos, J. D., Musty, R. E. and Bucci, D. J., 2006. Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *European Journal of Pharmacology* 539, 177-183.
- Atsak, P., Roozendaal, B. and Campolongo, P., 2012. Role of the endocannabinoid system in regulating glucocorticoid effects on memory for emotional experiences. *Neuroscience* 204, 104-116.
- Auclair, N., Otani, S., Soubrie, P. and Crepel, F., 2000. Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology* 83, 3287-3293.
- Beecher, M. D. and Burt, J. M., 2004. The role of social interaction in bird song learning. *Current Directions in Psychological Science* 13, 224-228.
- Bradley, M. M., Greenwald, M. K., Petry, M. C. and Lang, P. J., 1992. Remembering pictures: pleasure and arousal in memory. *Journal of Experimental Psychology Learning, Memory, and Cognition* 18, 379-390.
- Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M. B. and Blandina, P., 2006. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning & Memory* 13, 426-430.
- Campolongo, P., Morena, M., Scaccianoce, S., Trezza, V., Chiarotti, F., Schelling, G., Cuomo, V. and Roozendaal, B., 2013. Novelty-induced emotional arousal modulates cannabinoid effects on recognition memory and adrenocortical activity. *Neuropsychopharmacology* 38, 1276-1286.
- Campolongo, P., Ratano, P., Manduca, A., Scattoni, M. L., Palmery, M., Trezza, V. and 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. and 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, 4888-4893.
- de Oliveira Alvares, L., de Oliveira, L. F., Camboim, C., Diehl, F., Genro, B. P., LANZIOTTI, V. B. and Quilfeldt, J. A., 2005. Amnesic 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, 119-124.
- de Quervain, D. J., Roozendaal, B. and McGaugh, J. L., 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.
- Deecke, V. B., Ford, J. K. and Spong, P., 2000. Dialect change in resident killer whales: implications for vocal learning and cultural transmission. *Animal Behaviour* 60, 629-638.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C. and Tasker, J. G., 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *The Journal of Neuroscience* 23, 4850-4857.
- Dudai, Y., 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology* 55, 51-86.
- Evanson, N. K., Tasker, J. G., Hill, M. N., Hillard, C. J. and Herman, J. P., 2010. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 151, 4811-4819.
- Finch, D. M., 1996. Neurophysiology of converging synaptic inputs from the rat prefrontal cortex, amygdala, midline thalamus, and hippocampal formation onto single neurons of the caudate/putamen and nucleus accumbens. *Hippocampus* 6, 495-512.
- Finn, D. P., 2010. Endocannabinoid-mediated modulation of stress responses: physiological and pathophysiological significance. *Immunobiology* 215, 629-646.
- Fuentes-Ibáñez, A., 2015. Posible interacción de los glucocorticoides y los endocannabinoides en el estriado dorsal sobre la consolidación de la memoria. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gerfen, C. R., 2004. Basal ganglia. Paxinos, G. (ed) *The rat nervous system*. Elsevier Academic, Amsterdam. P. 445-508
- Gold, P. E., Hankins, L., Edwards, R. M., Chester, J. and McGaugh, J. L., 1975. Memory interference and facilitation with posttrial amygdala stimulation: Effect on memory varies with footshock level. *Brain Research* 86, 509-513.
- Guyton, A. C. and Hall, J. E., 2011. *Tratado de fisiología medica*, 12 edn. McGraw-Hill Interamericana, México, DF, 1112 p.
- Haines, D. E., 2002. *Principios de Neurociencia*. Elsevier España S.A., Madrid.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., de Costa, B. R. and Richfield, E. K., 1991. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Research* 547, 267-274.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R. and Rice, K. C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1932-1936.

- Hill, M. N. and 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, 4579-4580.
- Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Pan, B., Fitzgerald, M. L., Roberts, C. J., Lee, T. T., Karatsoreos, I. N., Mackie, K., Viau, V., Pickel, V. M., McEwen, B. S., Liu, Q. S., Gorzalka, B. B. and Hillard, C. J., 2011. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *The Journal of Neuroscience* 31, 10506-10515.
- Izquierdo, I., Quillfeldt, J. A., Zannata, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K. and Medina, J. H., 1997. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience* 9, 786-793.
- Joëls, M. and Baram, T. Z., 2009. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 459-466.
- Joy, J. E., Watson Jr., S. J. and Benson Jr., J. A., 1999. Marijuana and medicine: Assessing the science base. National Academies Press.
- Kandel, E., 2013. *Principles of Neural Science*, 5 th edn. McGraw-Hill Education.
- Kramer, J. H., 2010. Memory, episodic. Whitaker, H. (ed) *Concise encyclopedia of brain and language*. Elsevier, Oxford, UK. P. 329-331.
- Manser, M. B., 2001. The acoustic structure of suricates' alarm calls varies with predator type and the level of response urgency. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268, 2315-2324.
- Markowitsch, H. J., 1995. Which brain regions are critically involved in the retrieval of old episodic memory? *Brain Research Brain Research Reviews* 21, 117-127.
- McDonald, R. J. and White, N. M., 1993. A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience* 107, 3-22.
- McGaugh, J. L., 2002. Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends in Neurosciences* 25, 456.
- McGaugh, J. L., 2006. Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends in Cognitive Sciences* 10, 345-347.
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B. and 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, 673-677.
- Moldrich, G. and Wenger, T., 2000. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21, 1735-1742.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N. and O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.

- National Research Council, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edn. National Academy of Sciences, Washington DC, p.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. SENASICA, México, 65.
- Paxinos, G. and Watson, C., 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edn. Academic Press, San Diego.
- Purves, D., 2004. Neuroscience. Sinauer Associates Incorporated.
- Reibaud, M., Obinu, M. C., Ledent, C., Parmentier, M., Bohme, G. A. and Imperato, A., 1999. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *European Journal of Pharmacology* 379, R1-2.
- Riebe, C. J. and Wotjak, C. T., 2011. Endocannabinoids and stress. *Stress* 14, 384-397.
- Roozendaal, B., 2000. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 25, 213-238.
- Rueda-Orozco, P. E., Montes-Rodriguez, C. J., Soria-Gomez, E., Mendez-Diaz, M. and Prospero-Garcia, O., 2008. Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. *Neuropharmacology* 55, 55-62.
- Rypstra, A. L., Wieg, C., Walker, S. E. and Persons, M. H., 2003. Mutual mate assessment in Wolf spiders: Differences in the cues used by males and females. *Ethology* 109, 315-325.
- Sanchez-Resendis, O., Medina, A. C., Serafin, N., Prado-Alcala, R. A., Roozendaal, B. and Quirarte, G. L., 2012. Glucocorticoid-cholinergic interactions in the dorsal striatum in memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6, 33.
- Sandi, C. and Rose, S. P., 1997. Training-dependent biphasic effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance task in chicks. *Psychopharmacology* 133, 152-160.
- Siller Pérez, C., Serafín, N., Campolongo, P., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B. and Quirarte, G. L., Facilitación de la memoria a través de glucocorticoides: interacción con los endocannabinoides estriatales. In: *II Reunión de Aprendizaje y Memoria, Campus UNAM, Juriquilla, Qro.*, 29 al 31 de octubre de 2014 2014. C-9.
- Slotnick, B. M. and Jarvik, M. E., 1966. Deficits in passive avoidance and fear conditioning in mice with septal lesions. *Science* 154, 1207-1208.
- Squire, L. R., 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82, 171-177.
- Squire, L. R. and Zola-Morgan, S., 1988. Memory: brain systems and behavior. *Trends in Neurosciences* 11, 170-175.
- Tulving, E., 1972. Episodic and semantic memory. Tulving, E. and Donaldson, W. (eds) *Organization of memory*. Academic Press, New York, NY. P. 381-402

- Ueda, N., 2002. Endocannabinoid hydrolases. Prostaglandins & other lipid mediators 68, 521-534.
- Varvel, S. A. and Lichtman, A. H., 2002. Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 301, 915-924.
- White, N. M. and McDonald, R. J., 2002. Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. Neurobiology of Learning and Memory 77, 125-184.
- Wilson, R. I., Kunos, G. and Nicoll, R. A., 2001. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. Neuron 31, 453-462.
- Wilson, R. I. and Nicoll, R. A., 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. Science 296, 678-682.