

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Instituto de Fisiología
Lab. de Neuropsiquiatría
Posgrado en Ciencias Fisiológicas

Tesis

Efecto de la transmisión glutamatérgica en los tipos de espinas dendríticas, expresión astrocítica y señalización de las neuronas del hipocampo dorsal en los procesos de aprendizaje y memoria.

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Fisiológicas
Presenta:

Q.F.B. Cesar Arturo Pinzón Parra

Director de Tesis:
Dr. Gonzalo Flores Álvarez

Índice de figuras y tablas

FIGURA 1. FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS CONEXIONES DEL HIPOCAMPO, EL DG, EL SUB Y LA EC..	5
FIGURA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES A GLUTAMATO.	9
FIGURA 3. IGLUR TIPO NMDA.	10
FIGURA 4. TOPOLOGÍA DE LAS SUBUNIDADES DE LOS IGLUR'S.	11
FIGURA 5. MECANISMOS MOLECULARES QUE ENLOBAN EL INICIO Y EL MANTENIMIENTO DE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA	12
FIGURA 6. TIEMPO DE RECONOCIMIENTO A LOS 2 PRIMEROS OBJETOS DEL GRUPO D-AP5, GYKI Y UBP.	22
FIGURA 7. TIEMPO DE RECONOCIMIENTO AL PRIMER OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO D-AP5, GYKI Y UBP.	23
FIGURA 8. TIEMPO DE RECONOCIMIENTO AL SEGUNDO OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO D-AP5, GYKI Y UBP.	24
FIGURA 9. EXPOSICIÓN A LOS 2 PRIMEROS OBJETOS DEL GRUPO D-AP5 (ANTAGONISTA DE LOS NMDAR'S).	25
FIGURA 10. EXPOSICIÓN A LOS 2 PRIMEROS OBJETOS DEL GRUPO GYKI (ANTAGONISTA DE LOS AMPAR'S).	25
FIGURA 11. EXPOSICIÓN A LOS 2 PRIMEROS OBJETOS DEL GRUPO UBP302 (ANTAGONISTA DE LOS KAR'S).	25
FIGURA 12. EXPOSICIÓN AL PRIMER OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO D-AP5 (ANTAGONISTA DE LOS NMDAR'S).	26
FIGURA 13. EXPOSICIÓN AL PRIMER OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO GYKI (ANTAGONISTA DE LOS AMPARS).	26
FIGURA 14. EXPOSICIÓN AL PRIMER OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO UBP302 (ANTAGONISTA DE LOS KARs).	26
FIGURA 15. EXPOSICIÓN AL SEGUNDO OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO D-AP5 (ANTAGONISTA DE LOS NMDARs).	27
FIGURA 16. EXPOSICIÓN AL SEGUNDO OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO GYKI (ANTAGONISTA DE LOS AMPARS).	27
FIGURA 17. EXPOSICIÓN AL SEGUNDO OBJETO NOVEDOSO DEL GRUPO UBP (ANTAGONISTA DE LOS KARs).	27
FIGURA 18. DENSIDAD DE ESPINAS DEL HIPOCAMPO DORSAL CA1 DEL GRUPO D-AP5.	28
FIGURA 19. DENSIDAD DE ESPINAS DEL HIPOCAMPO DORSAL CA1 DEL GRUPO GYKI.	28
FIGURA 20. DENSIDAD DE ESPINAS DEL HIPOCAMPO DORSAL CA1 DEL GRUPO UBP.	28
FIGURA 21. TIPIFICACIÓN DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DEL HIPOCAMPO DORSAL CA1 DEL GRUPO D-AP5.	29
FIGURA 22. TIPIFICACIÓN DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DEL HIPOCAMPO DORSAL CA1 DEL GRUPO GYKI.	30
FIGURA 23. TIPIFICACIÓN DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DEL HIPOCAMPO DORSAL CA1 DEL GRUPO UBP-302.	30
FIGURA 24. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS GFAP, ACTINA Y SINAPTOFISINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA1.	31
FIGURA 25. EXPRESIÓN DE GFAP EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA1.	32
FIGURA 26. EXPRESIÓN DE ACTINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA1.	32
FIGURA 27. EXPRESIÓN DE SINAPTOFISINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA1.	32
FIGURA 28. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS GFAP, ACTINA Y SINAPTOFISINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA3.	33
FIGURA 29. EXPRESIÓN DE GFAP EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA3.	34
FIGURA 30. EXPRESIÓN DE ACTINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA3.	34
FIGURA 31. EXPRESIÓN DE SINAPTOFISINA EN EL HIPOCAMPO DORSAL CA3.	34
FIGURA 32. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS GFAP, ACTINA Y SINAPTOFISINA EN EL DG.	35
FIGURA 33. EXPRESIÓN DE GFAP EN EL DG.	36
FIGURA 34. EXPRESIÓN DE ACTINA EN EL DG.	36
FIGURA 35. EXPRESIÓN DE SINAPTOFISINA EN EL DG.	36
TABLA 1. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS ESPECÍFICOS DE LOS IGLURS.	11
TABLA 2. TREN DE REVELADO PARA LA TINCIÓN DE GOLGI-COX.	20

Índice

1. Introducción	1
1.1 Aprendizaje y memoria.....	1
1.2 Prueba conductual de reconocimiento de objetos (NOR).....	4
1.3 El hipocampo	5
1.4 Los receptores a glutamato como principales receptores involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje	6
1.4.1 Receptores de glutamato y los tipos de espinas dendríticas	6
1.4.2 Receptores a glutamato de tipo metabotrópicos	9
1.4.3 Receptores de glutamato de tipo ionotrópicos	10
1.4.3.1 Receptores a glutamato de tipo NMDA	12
1.4.3.2 Receptores a glutamato de tipo AMPA	13
1.4.3.3 Receptores a glutamato de tipo KA.....	13
2. Planteamiento del problema	15
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivo general	16
5.1 Objetivos particulares	16
6. Diagrama de trabajo.....	17
7. Desarrollo experimental	18
7.1 Sujetos de experimentación.....	18
7.2 Procedimiento	18
7.3 Prueba conductual de reconocimiento de objetos (NOR).....	18
7.4 Perfusión	19
7.5 Obtención de la muestra	19
7.6 Densidad y tipificación de espinas.....	20
7.7 Preparación de los tejidos cerebrales para las técnicas histológicas	20
7.8 Técnica de inmunofluorescencia	21
7.9 Estadística.....	21
8. Resultados	22

8.1 Efecto de la administración crónica de antagonistas específicos para los iGluRs en la etapa neonatal.....	22
8.1.1 Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR).....	22
8.1.2 Densidad de espinas dendríticas.....	28
8.1.3 Tipificación de las espinas dendríticas.....	29
8.1.4 Expresión de GFAP, actina y sinaptofisina.....	31
9. Discusión de los resultados.....	37
9.1 Efecto de la administración crónica de antagonistas específicos para los iGluRs en la etapa neonatal.....	37
9.1.1 Prueba de reconocimiento de objetos (NOR).....	37
9.1.2 Densidad y tipificación de las espinas dendríticas.....	39
9.1.3 Expresión de GFAP, actina y sinaptofisina en CA1, CA3 y DG.....	44
10. Conclusiones.....	47
11. Bibliografía.....	48

Abreviaturas

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMPA's	Receptores de AMPA
Ca	Calcio
CPF	Corteza prefrontal
D-AP5	Ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanóico
DG	Giro dentado
DLP	Depresión a largo plazo
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Día postnatal
DPS	Densidad postsináptica
EC	Corteza entorrinal
fEPSP	Potenciales postsinápticos excitatorios de campo
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
GluR's	Receptores a glutamato
GYKI 53655	1-(4-aminofenil)-3-metilcarbamil-4-metil-3,4-dihidro-7,8-metilenedioxi-5H-2,3-benzodiazepina hidrociorada
iGluR's	Receptores a glutamato ionotrópicos
K	Potasio
KA	Ácido kaínico
KAR's	Receptores de KA
ME	Memoria explícita
MF	Fibras musgosas
Mg	Magnesio
mGluR's	Receptores a glutamato metabotrópicos
MI	Memoria implícita
MT	Memoria de trabajo
Na	Sodio
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
NMDAR's	Receptores de NMDA
NOR	Novel object recognition
NRC	National Research Council
PCP	Fenciclidinas
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLP	Potenciación a largo plazo
SC	Colaterales de Schaffer
SNC	Sistema nervioso central
SSI	Solución salina isotónica
Sub	Subiculum
SYP	Sinaptofisina
UBP-302	(S)-1-(2-amino-2-carboxietil)-3-(2-carboxibenzil)-pirimidina-2,4-diona
Zn	Cinc

Resumen.

Dos de los medios principales para la adaptación y supervivencia de los animales son el aprendizaje y la memoria; el hecho de adquirir cierta información para utilizarla posteriormente en nuestro favor ha contribuido en gran medida a nuestra supervivencia y por ende ha ayudado a nuestra evolución. El aprendizaje puede ser definido desde un estricto sentido fisiológico como el proceso mediante el cual el SNC sufre cambios debido a la experiencia y estos cambios se manifiestan en el comportamiento de los organismos; de la misma manera la memoria puede ser definida como la capacidad de almacenar la información que se obtuvo durante el aprendizaje y esto nos ayuda a evocar dicha información en momentos adecuados. Se ha observado que el proceso del aprendizaje y la memoria están relacionados con una eficiente sinapsis neuronal, la cual a su vez se puede relacionar con una correcta maduración de las espinas dendríticas, éstas se forman en las primeras etapas del desarrollo poco después de los procesos dendríticos de las neuronas, donde se ha visto que los receptores a glutamato tienen una función importante. Por dicha razón se evaluaron los efectos a largo plazo de una administración crónica de 3 antagonistas específicos a estos receptores: 1) D-AP5 (Ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanóico), antagonista a los receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico); 2) GYKI 53655 (1-(4-aminofenil)-3-metilcarbamil-4-metil-3,4-dihidro-7,8-metilenedioxi-5H-2,3-benzodiazepina hidroclicorada), antagonista a los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico); y 3) UBP-302 ((S)-1-(2-amino-2-carboxietil)-3-(2-carboxibenzil)-pirimidina-2,4-diona), antagonista a los receptores KA (ácido kaínico).

Observándose cambios conductuales en la prueba NOR (Novel Object Recognition) de los animales tratados con cada uno de los antagonistas; la administración de los antagonistas disminuye el índice de discriminación tanto al primer como al segundo objeto novedoso, demostrándose así que existen alteraciones del proceso de aprendizaje y memoria en estos animales. De la misma manera se observaron cambios en las espinas dendríticas a nivel morfológico y de su densidad, obteniéndose en general una disminución de la densidad total de espinas y en los tres casos un incremento de las espinas inmaduras (espinas delgadas) y una disminución de las espinas maduras (espinas de hongo y bifurcadas). Así también se evaluó la inmunorreactividad del GFAP, actina y sinaptofisina (proteínas relacionadas con la activación de los astrocitos, la modificación estructural del citoesqueleto y la liberación del neurotransmisor, respectivamente), obteniendo que la administración crónica de los antagonistas a los receptores a glutamato de tipo ionotrópicos no indujo la activación de los astrocitos y en cambio disminuyó la expresión de la actina y la sinaptofisina, lo que puede correlacionarse con las alteraciones que se presentaron en la densidad y en los tipos de espinas dendríticas, así como en la prueba conductual. Concluyendo que la administración crónica de estos antagonistas impide la correcta maduración de las espinas dendríticas del hipocampo dorsal, altera la expresión de actina y sinaptofisina, evitando así una eficiente sinapsis en este núcleo y alterando por lo tanto los procesos de aprendizaje y memoria.

1. Introducción

La supervivencia del más fuerte ha sido el mecanismo por el cual se rige la vida en la naturaleza (selección natural), y es que ser el más “fuerte” no habla de resistencia física, sino de la capacidad que deben tener los organismos para sobrevivir al ambiente que los rodea (por más hostil que este sea), ésta capacidad es lo que se conoce como adaptación. La adaptación le confiere a un organismo mostrar una característica determinada, la cual a su vez incrementa las posibilidades de supervivencia de dicho organismo.

Una característica muy sobresaliente de este tipo, que ha permitido la adaptación y por ende la supervivencia de los animales, ha sido el proceso del aprendizaje y la memoria. La adquisición de la información para posteriormente utilizarla a nuestro favor es un hecho que ha contribuido en gran medida a nuestra evolución y supervivencia.

Los mecanismos por los cuales el cerebro procesa la información que recibe del ambiente ha sido foco de interés por mucho tiempo. Sin embargo empezaron a tomar un camino más molecular desde que Santiago Ramón y Cajal dedujo que las modificaciones estructurales que existen entre las conexiones (sinapsis) de las neuronas excitatorias podrían proporcionar un mecanismo por el cual el cerebro procesa y retiene la información. Así mismo diversos estudios han mostrado la importancia de las espinas dendríticas en el proceso de la información, ya que la mayoría de las entradas sinápticas excitatorias en el cerebro ocurren en las espinas dendríticas (más del 90 %), además las espinas dendríticas son altamente modificables, proceso que se denomina plasticidad dendrítica.

De lo anterior se puede deducir la gran importancia que tiene la adquisición de la información, y por tanto se vuelve fundamental entender el mecanismo por el que se llevan a cabo los procesos del aprendizaje y de la memoria; lo que a su vez ayuda a esclarecer la fisiopatología de las alteraciones neuronales que engloban a estos procesos, tales como el Alzheimer, la amnesia y la epilepsia.

1.1 Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son los medios principales de adaptación de los seres vivos, con los cuales se superan las modificaciones inciertas del entorno. Estrictamente desde el punto de vista neurofisiológico, se conoce como aprendizaje al proceso que ocurre cuando la experiencia produce cambios en el sistema nervioso central (SNC), estos cambios pueden ser breves (segundos) o duraderos (meses) y se manifiestan en el comportamiento de los organismos; el aprendizaje es el proceso por el cual se adquiere cierta información que ocurre en un preciso momento. El aprendizaje también puede definirse desde otras perspectivas donde además de los fenómenos fisiológicos se toman en cuenta algunas cuestiones psicológicas, por ejemplo el aprendizaje según Hilgard se refiere al proceso mediante el cual se origina o se modifica una actividad respondiendo a una situación siempre que los cambios no puedan ser atribuidos al crecimiento o al estado temporal del organismo, y de acuerdo a Feldman también se puede definir el aprendizaje como un

proceso de cambio relativamente permanente en el comportamiento de una persona generado por la experiencia [Feldman, 2005; Relloso, 2007]. Por su parte la memoria es la capacidad que se tiene para almacenar la información que se obtuvo con el aprendizaje y poder evocarla en momentos adecuados; es un fenómeno inferido a partir de los cambios en el SNC provocados por el aprendizaje y le da a nuestras vidas un sentido de continuidad. El aprendizaje es la base de la memoria, si no hay aprendizaje no puede haber memoria [Morgado, 2005; Johansen y cols., 2011].

El aprendizaje consiste en la denominada plasticidad sináptica de Hebb. En 1949 Donald Hebb propuso que una entrada sináptica puede fortalecerse cuando la actividad de la neurona presináptica coocurre con la actividad de la neurona postsináptica [Sejnowski, 1999]. Por su parte en 1973 Terje Lomo y Timothy Bliss descubrieron que una estimulación de frecuencia moderadamente alta, entre las sinapsis de la vía perforante (conexión entre la corteza entorrinal con el giro dentado) y las células granulares del giro dentado, produce incrementos estables y duraderos de la respuesta postsináptica, lo que denominaron potenciación a largo plazo (PLP) [Morgado, 2005]. Por otra parte se sabe que la PLP puede ser interrumpida y hasta revertida por la propia actividad sináptica, fenómeno denominado *depotenciación*, lo que a su vez llevo a considerar el término depresión a largo plazo (DLP). La DLP hace referencia al fenómeno que ocurre cuando algunos patrones de frecuencia que activan algunos receptores a glutamato no producen una PLP, sino que se produce una *depotenciación* de la eficacia sináptica; sin embargo no fue sino hasta 1992 cuando se estableció un protocolo que realmente podría provocar de manera fiable una DLP de las respuestas sinápticas basales en el hipocampo [Dudek y Bear, 1992]. Estos y otros estudios celulares y moleculares [Bliss y Collingridge, 1993; Bear y Malenka, 1994; Malenka y Bear, 2004] determinaron que la PLP y la DLP pueden tener una función crítica en la plasticidad dependiente de la experiencia, llegando a concluir que la modulación de la fuerza sináptica podría ser la base del aprendizaje y la memoria.

A excepción de situaciones con alto contenido emocional, las memorias no suelen formarse de modo instantáneo cuando se recibe la información a través de la experiencia. El proceso de formación de la memoria incluye al menos 2 etapas subsecuentes: la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo es un sistema para almacenar una cantidad limitada de información (generalmente menos de 12 dígitos) durante un corto periodo de tiempo, es una memoria inmediata para los estímulos que acaban de ser percibidos y se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares, en las sinapsis. Ahora si el estímulo es repetido una y otra vez, esta repetición puede activar mecanismos de plasticidad neuronal produciendo finalmente cambios estructurales en las sinapsis y estos cambios constituyen el soporte físico de la segunda etapa, la memoria a largo plazo, la cual, a diferencia de la primera, es una memoria estable y duradera [Lamprecht y LeDoux, 2004; Morgado, 2005]. Este proceso por el cual la reiteración de las memorias de corto plazo produce los cambios neuronales que originan la memoria a largo plazo se denomina *consolidación de la memoria*, es decir, la evocación de la información

almacenada y el paso del tiempo suelen conferirle a la memoria una determinada estabilidad [Morgado, 2005].

En general se han determinado tres sistemas de memoria: La *memoria implícita* (MI), la *memoria explícita* (ME) y la *memoria de trabajo* (MT). La MI es la memoria que nos permite ejercer hábitos cognitivos y motores, es decir, es la memoria de las cosas que solemos hacer, se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica, se lleva a cabo de manera automática, inconsciente y generalmente es difícil de verbalizar (por lo cual también se le conoce como *memoria no explícita*). Este tipo de memoria deriva de los tipos de aprendizaje básicos y filogenéticamente antiguos, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor, o los condicionamientos clásico e instrumental y su principal lugar de almacenamiento radica en estructuras subcorticales como el neocórtex (caudado y putamen), la amígdala e inclusive el cerebelo [Kida y cols., 2002; Maren y cols., 2003; Jiménez-Díaz y cols., 2004; Morgado, 2005].

La ME es la memoria que almacena la información de los hechos (memoria semántica) y eventos (memoria episódica), así como también nos permite identificar la relación temporal y espacial entre ellos, es decir, esta memoria nos permite saber el “qué”, “cuándo” y “dónde” de las cosas [Tulving, 1983; Eacott y Norman, 2004]. Se expresa conscientemente y es fácil de declararla de manera verbal o escrita (por lo que también se le conoce, en los humanos, como memoria declarativa). A diferencia de la MI, este tipo de memoria puede adquirirse en pocos ensayos, su adquisición se relaciona con el sistema hipocámpal y otras estructuras del lóbulo temporal medial, aunque su almacenamiento definitivo parece radicar en diferentes áreas de la corteza cerebral. La ME resulta de un aprendizaje relacional, el cual consiste en analizar, comparar y contrastar diferentes tipos de información. Un buen ejemplo de este tipo de memoria es la memoria que nos permite orientarnos espacialmente, así como la memoria que nos permite familiarizarnos con las características de los objetos, es decir, el reconocimiento de objetos [Ennaceur y Delacour, 1988; Maguire y cols., 1998; Ergorul y Eichenbaum, 2004; Morgado, 2005].

La llamada MT consiste en la representación consciente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones cognitivas complejas, tales como la comprensión del lenguaje o el razonamiento. Es de suma importancia puesto que contribuye a la memoria a largo plazo y tiene que ver con la inteligencia, es decir, se relaciona con la capacidad de razonamiento general y la resolución de problemas [Conway y cols., 2003; Gray y Thompson, 2004]. En un experimento clásico con electrodos implantados en el cerebro de monos se observó que la base y sede de la MT podría ser la corteza prefrontal (CPF) [Fuster y Alexander, 1971]. Sin embargo en trabajos posteriores se demostró que en realidad la CPF, más que almacenar la información, podría funcionar como una fuente de control de ida y vuelta de la información desde las regiones corticales posteriores (tal como la corteza premotora y parietal), en donde sí se podría almacenar dicha información [Curtis y D’Esposito, 2003]. En definitiva, la MT, más que una simple memoria parece consistir en un sistema general de control cognitivo y de procesamiento ejecutivo que guía el comportamiento y que implica interacciones entre los diversos

procesos mentales (atención, percepción, motivación, emociones y memoria) [Morgado, 2005].

La anterior clasificación es de amplio consenso y ha demostrado ser muy indicada, sin embargo su consistencia ha sido cuestionada en ciertas ocasiones, por lo que parece prudente considerarla provisional y suponer que el nuevo conocimiento dará lugar a otras categorías más acordes con nuevos hallazgos tanto experimentales como clínicos. Existen diversos modelos conductuales que nos permiten evaluar el aprendizaje y la memoria en los animales por ejemplo el laberinto de 8 brazos, el laberinto acuático de Morris y la prueba de reconocimiento de objetos (NOR), sin embargo de estos modelos el que produce una condición mucho menos estresante para el animal es este último.

1.2 Prueba conductual de reconocimiento de objetos (NOR)

La capacidad de la memoria de reconocimiento ha sido particularmente bien documentado en ratones, ratas y monos, así como en los seres humanos. El reconocimiento de objetos es la capacidad de percibir un objeto de propiedades físicas (por ejemplo, forma, color y textura) y aplicar atributos semánticos al objeto, que incluye la comprensión de su uso, la experiencia previa con el objeto y cómo se relaciona con los demás objetos [Enns, 2004; Ennaceur, 2010].

La prueba de reconocimiento de objetos es una prueba conductual que nos permite observar conductas tales como la actividad motora, el aprendizaje y la memoria tanto a corto como a largo plazo. Esta prueba se basa en la atención que le confiere cada animal a un objeto en un espacio delimitado y, a diferencia de otras pruebas, en la prueba de reconocimiento de objetos no existen recompensas, el animal explora los objetos gracias a la tendencia natural que tiene por explorar un estímulo novedoso [Ennaceur y Delacour, 1988; Baxter, 2010]. La prueba está conformada por 4 estados: en el primer estado se lleva a cabo el procesamiento de los componentes básicos de los objetos tales como el color, la profundidad y la forma; el segundo estado es donde estos componentes básicos se agrupan sobre una base de similitud, la cual proporciona información sobre los bordes definidos para la forma visual; en el tercer estado la representación visual hace correspondencia con la descripción estructural que se encuentra en la memoria; por último en el cuarto estado se aplica la semántica de los atributos a la representación visual, proporcionando un significado, y de este modo, el reconocimiento [Humphreys y cols., 1999; Riddoch y Humphreys, 2001; Ward, 2006]. La memoria de reconocimiento es un tipo de memoria que pertenece a la memoria explícita o declarativa y se ha asociado de manera muy particular al hipocampo, el cual a su vez se ha asociado también a otros tipos de memoria, tal como la memoria de tipo espacial [Clark y cols., 2000; Buckmaster y cols., 2004; Eacott y Norman, 2004; Hammond y cols., 2004; Antunes y Biala, 2012].

1.3 El hipocampo

El hipocampo, del latín *hippocampus* (que a su vez procede del griego *hippos* que significa caballo), es un núcleo cerebral dividido en tres áreas CA1, CA2 y CA3 (las siglas CA hacen referencia a el término *Cornu Ammonis*, “asta de Amón” o “asta de carnero”, que fueron algunos de los primeros términos dados por algunos investigadores al hipocampo basados en la apariencia intraventricular de este núcleo cerebral), estas áreas forman al hipocampo propiamente dicho (Figura 1); mientras que el hipocampo en conjunto con el giro dentado (DG) y el subiculum (Sub) dan origen a la *formación hipocampal*. Las neuronas del hipocampo son neuronas piramidales glutamatérgicas, mientras que las del DG son neuronas granulares; la información entra por la corteza entorrinal (EC) y de ahí llega al DG, las neuronas del DG comunican con CA3 a través de las fibras musgosas (MF) y CA3 comunica con CA1 a través de las colaterales de Schaffer (SC), CA1 manda su información al Sub, y para completar el circuito el Sub manda la información hacia la salida de la EC [Amaral y Lavenex, 2007; Andersen y cols., 2007].

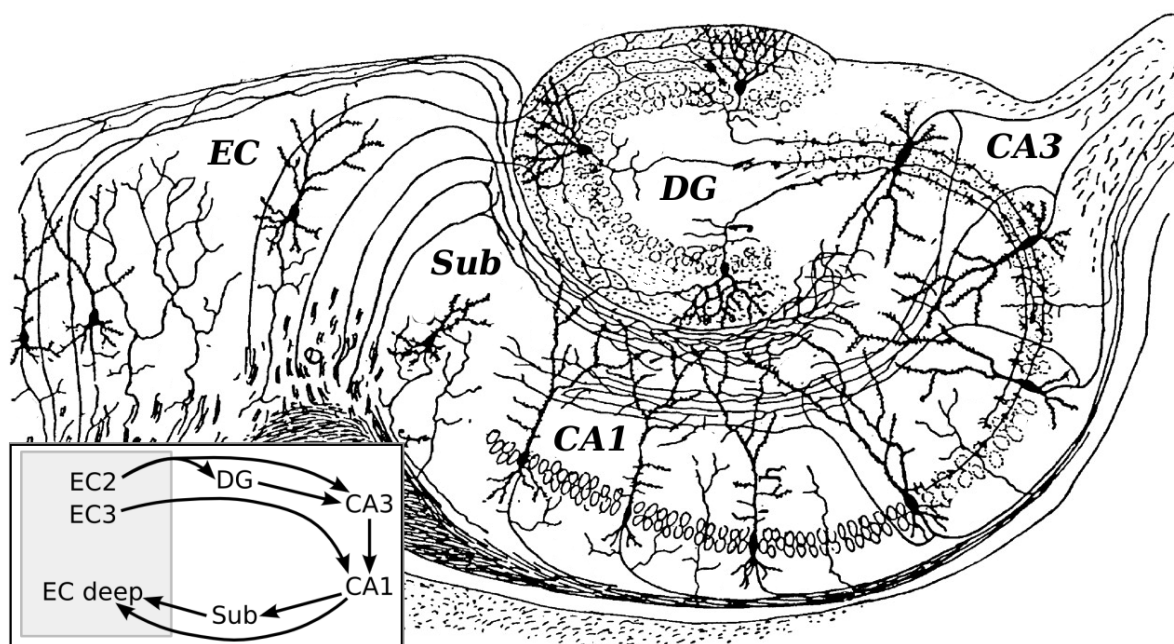


Figura 1. Esquema de las conexiones del hipocampo, el DG, el Sub y la EC. Tomado de Histologie du Système Nerveux de L’Homme & Des Vertébrés.

La transmisión sináptica excitatoria en el hipocampo es principalmente de tipo glutamatérgico y, por tanto, el glutamato junto con sus receptores tienen un papel fundamental en el mantenimiento y en la regulación de las sinapsis que se llevan a cabo en este núcleo. Actualmente se ha observado que los receptores a glutamato tienen una función importante precisamente en la modulación de la fuerza sináptica así como en el desarrollo de las neuronas, en la plasticidad neuronal, y en la neurodegeneración [Lerma, 2003;

Vesikansa, 2013]. Es por dicha razón que los receptores a glutamato han sido ligados fuertemente en la modulación de los mecanismos por los cuales se llevan a cabo el aprendizaje y la memoria.

1.4 Los receptores a glutamato como principales receptores involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje

1.4.1 Receptores de glutamato y los tipos de espinas dendríticas

La mayoría de las señalizaciones que se realizan entre una y otra neurona (u otra célula) es mediada por señales químicas en un proceso al cual denominamos neurotransmisión, y uno de los principales componentes de esta comunicación son los receptores, los cuales son proteínas encargadas de recibir un mensaje químico y traducirlo a una señal celular, sea eléctrica o no. Otro elemento muy importante para la neurotransmisión es la molécula química (el neurotransmisor) que llega y se une a su receptor [Lerma, 2003]. El principal neurotransmisor excitador del SNC de los mamíferos es el L-glutamato. Este neurotransmisor actúa como mediador de la transmisión sináptica y de los cambios duraderos en la eficacia sináptica, conocidos como LTP y LTD, los cuales se consideran el sustrato celular y molecular del aprendizaje y la memoria [Anwyl, 1999; Kandel y cols., 2000; Kreitzer y Malenka, 2008; Citri y Malenka, 2008; Neves y cols., 2008; Butz y cols., 2009]. Así mismo es bien sabido que los receptores a glutamato son los responsables en gran medida de la neurotransmisión en los contactos de tipo excitatorio del SNC y por ende la conectividad sináptica glutamatérgica ha sido foco de interés por diversos investigadores, lo que ha llevado a realizar diversos estudios que nos permiten analizar características de este proceso a lo largo del desarrollo, por ejemplo se sabe que la conectividad sináptica glutamatérgica en el hipocampo de rata se desarrolla durante las primeras dos semanas de vida e interesantemente las neuronas piramidales del hipocampo exhiben una relación cercana uno a uno en las sinapsis de tipo excitatorias [Fiala y cols., 1998; Hsia y cols., 1998; Tyzio y cols., 1999; Ritter y cols., 2002; Lerma, 2003; Vesikansa, 2013].

En el SNC maduro, la mayoría de las sinapsis excitatorias ocurren en las espinas dendríticas que emergen del árbol dendrítico [Yuste y Bonhoeffer, 2004]. Las espinas dendríticas son pequeñas salientes de la superficie dendrítica de las neuronas que consisten en una cabeza, con un volumen entre 0.004 a $2 \mu\text{m}^3$, conectada al eje dendrítico por un cuello fino de 0.04 - $1 \mu\text{m}$ de diámetro y con una longitud de 0.1 - $2 \mu\text{m}$. Las espinas difieren en su morfología a través de los diversos tipos de células nerviosas, son heterogéneas en forma y tamaño, en particular en la corteza y el hipocampo de mamíferos, y han sido clasificadas basados en la longitud de su cuello, el tamaño y número de la cabeza, en 4 categorías diferentes [Harris y cols., 1992]:

- 1) Delgada.- Tienen una cabeza pequeña y cuello estrecho.
- 2) Gruesa o corta.- No muestran ninguna subdivisión en la cabeza.

- 3) Hongo.- Tienen una gran cabeza y un cuello estrecho.
- 4) Bifurcada.- Tienen múltiples cabezas que emergen de un origen común (este tipo de espina dendrítica sólo es observable en condiciones normales en el hipocampo).

Las espinas dendríticas muestran una dinámica notable en cuanto a su formación, eliminación y *plasticidad*, tanto morfológica como estructural, lo cual permite su regulación durante el desarrollo a través de las experiencias sensoriales [Silva-Gómez y cols., 2003; Alquicer y cols., 2008; Citri y Malenka, 2008]. La plasticidad, una de las más importantes y sobresalientes características del cerebro de los mamíferos, se define como la capacidad que tiene el cerebro, a través de la actividad neuronal, para generar modificaciones (tanto estructurales como funcionales) en los circuitos neuronales y, por ende, una modificación subsecuente de los procesos mentales tales como el pensamiento, las emociones y el comportamiento [Citri y Malenka, 2008].

Las espinas dendríticas son una de las estructuras más plásticas que reciben la mayoría de las sinapsis excitatorias glutamatérgicas de terminales presinápticas opuestas; de la misma manera la mayoría de las sinapsis glutamatérgicas son asimétricas y más del 90% de estas se llevan a cabo en las cabezas de las espinas dendríticas [Bourne y Harris, 2008]. En la actualidad se sabe que tanto el aprendizaje como la PLP inducida artificialmente producen cambios en la morfología de las espinas dendríticas, las cuales podrían constituir la base estructural de la memoria [Lamprecht y LeDoux, 2004; Bourne y Harris, 2007].

Con microscopía electrónica se ha demostrado que las espinas dendríticas contienen un número importante de organelos tales como el retículo endoplásmico liso (que participa en el manejo intracelular de Ca^{2+}), poliribosomas y mitocondrias; además a través de la microscopía también se ha sugerido que estas estructuras son unidades autónomas para la transmisión, la señalización, y la plasticidad sináptica [Alvarez y Sabatini, 2007]. La presencia, el tamaño, y la complejidad de estos organelos son generalmente proporcionales al tamaño y a la morfológica de las espinas, lo que sugiere que dependiendo del tamaño, las espinas pueden manejar Ca^{2+} y ser una estructura plástica.

La especialización ultraestructural más prominente de las espinas dendríticas es la densidad postsináptica (DPS), un material que visto al microscopio electrónico es denso y parecido a un disco, apenas situado por debajo de la membrana postsináptica a nivel de la cabeza de la espina dendrítica. La DPS es un ensamble macromolecular que contiene 400-500 proteínas. Estas proteínas incluyen receptores a glutamato, canales iónicos, cinasas de proteína (como la PKA), Ca^{2+} /calmodulina, fosfatasa, componentes del citoesqueleto y proteínas implicadas en el tráfico de la membrana [Yao y cols., 2008]. De esta manera la DPS se puede considerar como una serie de dispositivos que sirven para el procesamiento de señales asociadas al mantenimiento y a la plasticidad de las sinapsis; además de que la organización y la composición de la DPS no es estática, sino que está sujeta a una regulación dinámica que puede ser la base de la actividad y plasticidad sináptica en las espinas dendríticas [Ehlers, 2003].

Durante el desarrollo de la sinapsis, las espinas dendríticas de las neuronas piramidales en el hipocampo se extienden en numerosas protuberancias conocidas como filopodios, estas prolongaciones son muy móviles y llegan a extenderse hasta 10 μm de longitud. Pueden crecer y retraerse en cuestión de segundos a minutos, y esta movilidad les permite explorar el neuropil en busca de sinapsis [Yuste y Bonhoeffer, 2004]. Sin embargo cabe resaltar que los filopodios no son un tipo de espina dendrítica ya que, como se ha mostrado, los filopodios tienen una morfología totalmente diferente a las espinas dendríticas, los filopodios son mucho más dinámicos que las espinas y poseen diferentes componentes del citoesqueleto, además de que los filopodios también existen en células no neuronales (a diferencia de las espinas dendríticas que sólo ocurren en las neuronas) [Portera-Cailliau y Yuste, 2001].

Las espinas dendríticas tienen una función importante en la transmisión química y se activan en forma, número y tamaño como respuesta a variaciones sutiles en su medio extracelular, debido a una serie de diferentes factores, alterando así la actividad neuronal [Fiala y cols., 2002 a, b]. Para poder observar estas estructuras es de gran ayuda la técnica de Golgi-Cox, puesto que permite una clara observación de las espinas sin necesidad de utilizar alguna otra técnica mucho más costosa.

La técnica de impregnación argéntica (reacción negra), como la llamó Golgi, se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares cromato-argénticos, producidos por la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata. La impregnación revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones (al contrario de las técnicas histológicas convencionales, las cuales apenas permiten la observación del perfil del cuerpo neuronal y algunos fragmentos de dendritas en un solo plano).

El método de Golgi es una técnica muy útil y ampliamente utilizada que revela la estructura de las neuronas, las células gliales y sus procesos, tanto en el sistema nervioso normal como en un estado patológico. Las descripciones de las neuronas como hoy se conocen fueron posibles por la utilización de esta técnica de impregnación. Una de las estructuras finas que fueron reveladas por primera vez por el uso del método de Golgi y que llamó la atención de Santiago Ramón y Cajal fueron las espinas dendríticas, descritas por Cajal como pequeñas espinas que se proyectan desde las dendritas de la célula de Purkinje del cerebelo. Las espinas dendríticas se forman en las primeras etapas del desarrollo poco después de los procesos dendríticos de las neuronas, donde se ha visto que los receptores a glutamato tienen una función importante [Lerma, 2003; Morgado, 2005].

Para llevar a cabo sus acciones fisiológicas el glutamato actúa en 2 tipos de receptores: los receptores a glutamato metabotrópicos (mGluR's) y los receptores a glutamato ionotrópicos (iGluR's). Los primeros son receptores acoplados a la familia de las proteínas G, mientras que los segundos son canales iónicos de unión a ligando [Madden, 2002; Lerma, 2003; Vesikansa, 2013].

1.4.2 Receptores a glutamato de tipo metabotrópicos

Los mGluR's son receptores acoplados a una proteína G y ejercen su función por medio de una cascada de segundos mensajeros. Estos receptores son proteínas integrales de membrana cuya estructura molecular consiste en un gran dominio extracelular y uno intracelular, los cuales se encuentran separados por medio de siete segmentos transmembranales de tipo α -hélice unidos por tres bucles intracelulares y tres extracelulares. Los residuos aminoacídicos del segundo y tercer bucle intracelular constituyen la región más importante para la activación y el acoplamiento del receptor a la proteína G. A su vez los residuos del extremo C-terminal se han visto implicados en la desensibilización inducida por la PKC y en la interacción con proteínas intracelulares como la calmodulina [Pin y Duvoisin, 1995; Conn y Pin, 1997].

La familia de los mGluR's se encuentra formada por 8 subtipos nombrados mGluR1-8, reunidos en tres grupos que se basan en la homología de la secuencia de sus aminoácidos, en los mecanismos de transducción y en las propiedades farmacológicas que presentan (Figura 2) [Anwyl, 1999].

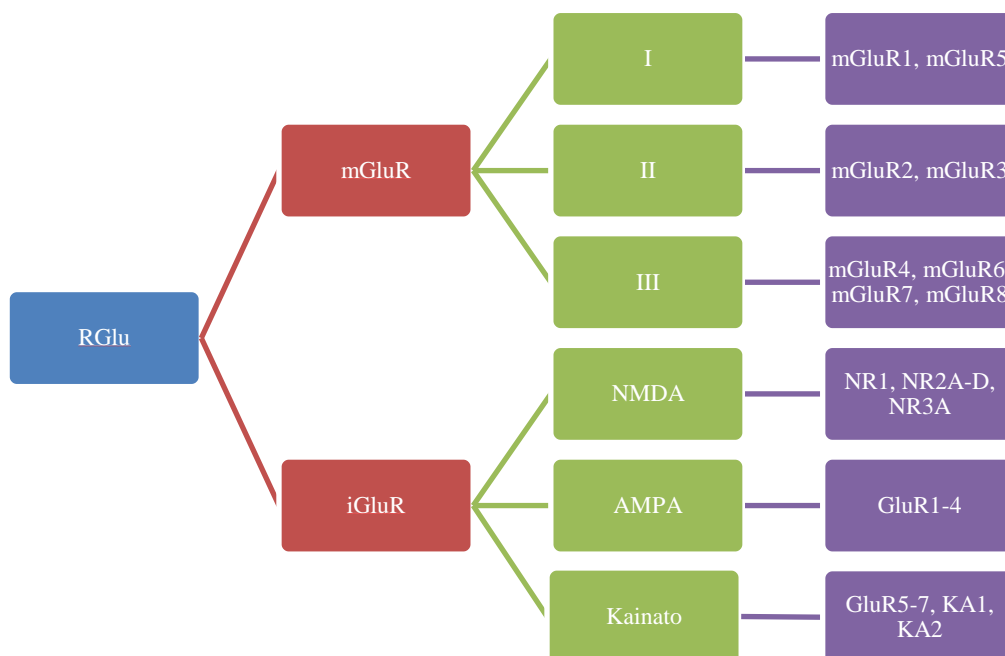


Figura 2. Clasificación de los receptores a glutamato

Los receptores metabotrópicos de glutamato postsinápticos (principalmente los del grupo I) participan en la regulación de la excitabilidad en las neuronas y en la regulación de corrientes por medio de receptores ionotrópicos de glutamato; los receptores del grupo II y

III son principalmente presinápticos y su activación reduce la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal [Goudet y cols., 2008]. Es decir que los mGluR's median la actividad de algunas enzimas de membrana, de canales iónicos y regulan así mismo la actividad sináptica excitadora lenta en el SNC; hecho que da origen a la diferencia entre estos receptores y los iGluR's.

1.4.3 Receptores de glutamato de tipo ionotrópicos

Por su parte los iGluR's se denominan así porque su activación conlleva a un incremento en la permeabilidad de la membrana, puesto que forman un canal iónico cuya apertura está acoplada a la unión de un agonista (ligando) y su activación permite el paso de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Figura 3), lo que se traduce a su vez en una despolarización de la neurona [Madden, 2002; Lerma, 2003]. Los iGluR's han sido divididos principalmente en 3 tipos de acuerdo a su farmacología (Figura 2):

1. Ácido N-metil-d-aspartico (NMDA)
2. Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA)
3. Ácido kaínico (KA)

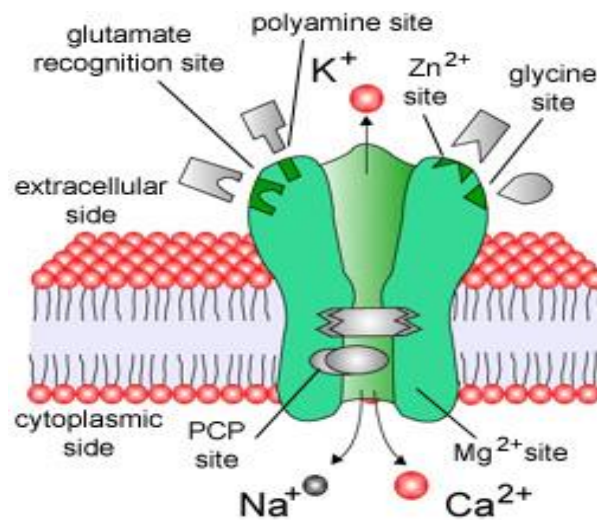


Figura 3. iGluR tipo NMDA. Se pueden observar los sitios de unión al ligando, coagonistas y reguladores alostéricos [tomado de Feldman y cols., 1997].

Tanto los receptores NMDA (NMDAR's), como los receptores AMPA (AMPA's) y los receptores KA (KAR's) comparten una estructura que consiste de un gran dominio extracelular amino terminal, de cuatro dominios membranales (1-4, los cuales cambian de nombre dependiendo del receptor del que se hable) y de un dominio intracelular carboxilo terminal (Figura 4). Los segmentos 1, 3 y 4 atraviesan la membrana, mientras que el segmento 2 no llega a cruzarla y es éste dominio, en conjunto con el 3 y parte del amino terminal, los que forman parte del sitio de reconocimiento del agonista [Madden, 2002;

Lerma, 2003; Traynelis y cols., 2010]. Las propiedades funcionales de los iGluR's se han podido describir gracias en parte al desarrollo de sustancias agonistas y antagonistas específicos (Tabla 1), que han facilitado su caracterización [Khodorova y cols., 2009].

Tabla 1. Agonistas y antagonistas específicos de los iGluR's

Tipo de receptor ionotrópico	NMDAR's	AMPA's	KAR's
Agonista	NMDA	AMPA	Kainato
Antagonista	Ketamina, AP5, D-AP5	GYKI-53655, GYKI-52466	UBP-302, UBP-296

Los iGluR's han sido foco de interés desde que se determinó que la activación de las sinapsis, en los núcleos cerebrales pertinentes, conlleva a una liberación de glutamato que a su vez activa a los AMPAR's y en instantes la consecuente despolarización local libera a los NMDAR's del Mg^{2+} (que normalmente los bloquea), permitiendo entonces un gran flujo postsináptico de Ca^{2+} a través de estos canales; esto a su vez origina la activación de cinasas que, modulando determinados sustratos, por un lado inducen cambios en el citoesqueleto de la neurona en minutos y por otro lado activan factores de transcripción que dan lugar a la síntesis de nuevas proteínas receptoras tanto de tipo AMPA como NMDA y KA, las cuales migran hacia los lugares modificados del citoesqueleto (las nuevas espinas) y en el plazo de horas se insertan en la membrana y contribuyen a la estabilización de los cambios estructurales de la neurona postsináptica (Figura 5) [Lamprecht y LeDoux, 2004; Malenka y Bear, 2004].

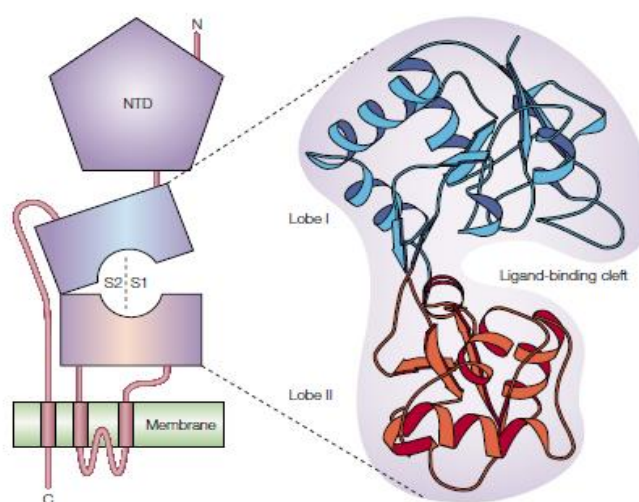


Figura 4. Topología de las subunidades de los iGluR's. Puede verse el sitio de unión al ligando (glutamato, NMDA, AMPA o kainato). Ésta topología es semejante en todos los iGluR's [tomado de Madden, 2002].

Los AMPAR's modulan la mayoría de la transmisión rápida de glutamato en las sinapsis glutamatergicas en el cerebro; los NMDAR's se han asociado a funciones de plasticidad sináptica y a mecanismos por los cuales se llevan a cabo los procesos de memoria y aprendizaje [Lynch, 2004; Vesikansa, 2013]; mientras que las funciones de los KAR's son poco convencionales, ya que aunque los KAR's pueden modular algunas señales postsinápticas excitatorias, su función primordial es actuar como moduladores de la transmisión sináptica a nivel presináptico [Lerma, 2003; Vesikansa, 2013]. Es por estas razones que el centro de este estudio son los receptores a glutamato de tipo ionotrópico.

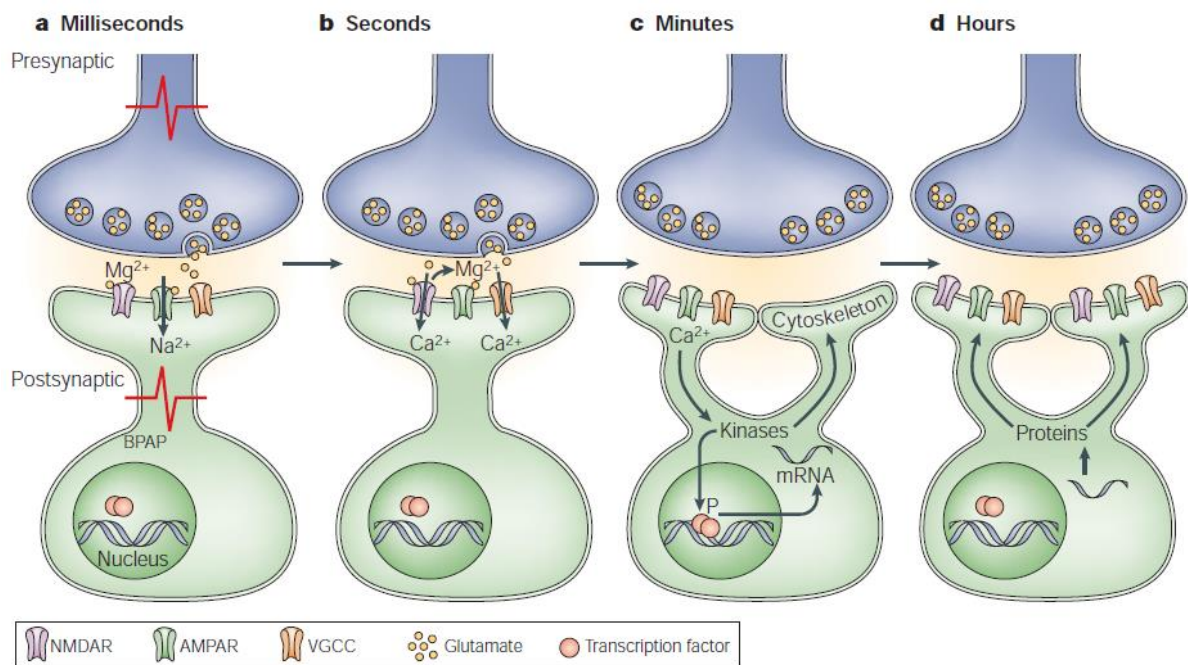


Figura 5. Mecanismos moleculares que engloban el inicio y el mantenimiento de la plasticidad sináptica. a) La liberación de glutamato permite la activación de los AMPAR's y la despolarización de la neurona postsináptica. b) La despolarización permite que los NMDAR's se liberen del Mg^{2+} y la consecuente entrada de Ca^{2+} a través de estos canales y de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC). c) El flujo de Ca^{2+} activa cinasas, las cuales a su vez modulan sustratos que contribuyen a los cambios estructurales por medio de la regulación del citoesqueleto o inducen la transcripción. d) Las nuevas proteínas se trasladan a la nueva espina formada para contribuir a su estabilización [tomado de Lamprecht y LeDoux, 2004].

1.4.3.1 Receptores a glutamato de tipo NMDA

Las cuatro subunidades de los NMDAR's pueden estar conformadas por 2 subunidades NR1 más dos subunidades que pueden ser NR2A-D ó NR3A-B. La combinación precisa de estas subunidades es lo que determina la fisiología de los NMDAR's [Cull-Candy y Leszkiewicz, 2004; Yashiro y Philpot, 2008].

Estos receptores son canales que poseen dos sitios de unión a ligando, uno para el glutamato y otro para la glicina, ambos necesarios para que se lleve a cabo la activación del

receptor y permita así el paso de los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . En condiciones fisiológicas los NMDAR's están bloqueados por un ión Mg^{2+} (Figura 3), y tienen una cinética de activación lenta y un tiempo de apertura prolongado [García y Pazos, 2004]. Así mismo este receptor cuenta con sitios de unión para reguladores alostéricos como lo son las fenciclidinas (PCP), la ketamina y el Zn^{2+} , los cuales inhiben las respuestas producidas por el agonista de manera independiente al voltaje [Macdonald y cols., 1991; Lerma y cols., 1991]; además las poliaminas (espermina y espermidina) potencian la respuesta del receptor [Lerma, 1991]. Es por esto que los NMDAR's se han visto involucrados en mecanismos que abarcan desde fenómenos de plasticidad sináptica, la PLP y procesos de muerte celular mediados por el glutamato [Nicoll y Malenka, 1995; Nicoll y Schmitz, 2005].

1.4.3.2 Receptores a glutamato de tipo AMPA

Los AMPAR's son los principales transductores de la neurotransmisión excitadora rápida en el cerebro de los mamíferos y son blanco de múltiples vías de señalización que median la fuerza de las sinapsis glutamatérgicas. Los receptores de tipo AMPA son tetrámeros con cuatro subunidades nombradas GluR1-4. A su vez la composición de las subunidades depende del núcleo cerebral, siendo así que en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo, la mayoría de los AMPAR's son heterómeros compuestos por las subunidades GluR2 más GluR1 o GluR3 [Collingridge y cols., 2004; Derchak y cols., 2007].

Los complejos multiproteicos que forman los AMPAR's, con diversas proteínas y subunidades auxiliares, influyen en muchos aspectos de su función como son la apertura, el tráfico y la estabilización en las sinapsis; siendo de esta manera que diversos mecanismos contribuyen a la complejidad de la funcionalidad de los AMPAR's y a la regulación de la fuerza sináptica y por tanto en la PLP [Derchak y cols., 2007].

Un aspecto molecular determinante para las propiedades de los AMPAR's es el aminoácido situado en la posición 586, que es glutamina (en GluR1, 3 y 4); siendo así que los canales formados por alguna de éstas subunidades presentan una marcada rectificación entrante, es decir, dejan pasar más corriente en sentido entrante que en sentido saliente y son permeables al calcio [Hollman y cols., 1991].

Los receptores de tipo AMPA se distribuyen en todo el cerebro, existiendo cambios en la expresión de éste según la etapa del desarrollo y el tipo de subunidad. Se encuentran altamente expresados en el hipocampo y en las capas superficiales de la corteza [Ritter y cols., 2002].

1.4.3.3 Receptores a glutamato de tipo KA

A mediados de los 1970's las acciones excitadoras y neurotóxicas del kainato eran bien conocidas y se postuló la hipótesis de que éste compuesto actuaba sobre un tipo específico de receptores [Watkins y Evans, 1981]. Los receptores de glutamato tipo kainato conforman uno de los componentes del sistema sináptico de señalización por glutamato en el SNC que ha sido más difícil de conocer a lo largo de los años, debido principalmente a la

ausencia de agentes farmacológicos que pudieran permitir la activación específica de estos receptores, razón por la cual el progreso del conocimiento de la función fisiológica de este receptor ha tenido lugar en los últimos años. Sin embargo la clonación de las subunidades de estos receptores, así como el descubrimiento de agentes farmacológicos selectivos, han posibilitado en la última década la definición de los procesos en los que los KAR's tienen alguna función [Lerma, 2006].

En la actualidad es bien conocido que la activación de los KAR's presinápticos puede producir una disminución en la liberación de glutamato. Se ha observado que una activación de los KAR's da lugar a una disminución de los potenciales excitadores postsinápticos (fEPSP) en las sinapsis de las fibras Musgosas con las células piramidales CA3 del hipocampo (MF-CA3); ésta disminución ocurre si se bloquean a los NMDAR's y a los AMPAR's [Kamiya y Ozawa, 1998]. Además de este efecto, en los últimos años se han proporcionado evidencias de que los KAR's pueden producir un aumento en la liberación de glutamato si la concentración del agonista (ya sea KA o el propio glutamato) es muy baja (20-50 nM). Se puede concluir entonces que los KAR's pueden producir una retroalimentación, positiva o negativa, dependiente de la concentración del agonista existente en el medio extracelular [Contractor y cols., 2001; Lauri y cols., 2001; Schmitz y cols., 2001]. Así mismo se observó, en experimentos con sinaptosomas (preparaciones que poseen una cantidad mínima o inexistente de membranas postsinápticas), que el efecto de un incremento en la liberación de glutamato se le puede atribuir a los KAR's que se encuentran a nivel presináptico [Rodríguez-Moreno y Sihra, 2004].

Por otra parte la elevada expresión de los KAR's durante la vida temprana postnatal, sugiere una función específica en la maduración de las sinapsis y en la regulación de los patrones de actividad eléctrica, lo que es crítico para el refinamiento de las nuevas conexiones [Bahn y cols., 1994; Ritter y cols., 2002; Vesikansa, 2013]. Por ejemplo durante el desarrollo temprano existe una elevada afinidad de los KAR's presinápticos a acoplarse a proteínas G. Así mismo cuando estos receptores se activan por un ambiente glutamatérgico se produce una disminución de la liberación de glutamato en las sinapsis de CA3-CA1. Por otro lado imitando la actividad de los KAR's, por medio de la activación farmacológica de GluK1, se ha observado un incremento permanente de sinapsis glutamatérgicas funcionales; mientras que un bloqueo de los KAR's durante un periodo de intensa sinaptogénesis da lugar a un decremento muy marcado de la conectividad glutamatérgica durante el desarrollo [Vesikansa, 2013]. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, la información que se tiene de las funciones de los KAR's es en su gran mayoría por estudios farmacológicos realizados en animales adultos, existiendo escasa información de la fisiología de los KAR's en etapas tempranas.

Finalmente, tomando en cuenta toda la información antes mencionada, se puede decir que la expresión de los receptores a glutamato y la función que desempeñan en las espinas dendríticas, son un hecho importante en el neurodesarrollo que al final participan modulando la PLP y la DLP, las cuales son las bases moleculares del aprendizaje y la memoria. Por lo tanto es, en este punto, donde toma importancia la participación de los

GluR's en conjunto con las espinas dendríticas y el saber un poco más sobre los mecanismos en los que participan se torna de sumo interés.

2. Planteamiento del problema

Diversos estudios han mostrado que los receptores a glutamato, especialmente los iGluRs, son los responsables en gran medida de los procesos que dan lugar a los mecanismos por los cuales se llevan a cabo el aprendizaje y la memoria en el hipocampo [Anwyl, 1999; Kandel y cols., 2000; Kreitzer y Malenka, 2008; Citri y Malenka, 2008; Neves y cols., 2008; Butz y cols., 2009]. La participación de los NMDAR's y de los AMPAR's se encuentra más esclarecida en este punto. Sin embargo éste no es el caso de los KAR's, además de que la información que existe para relacionar estos receptores con el tipo de espinas dendríticas que se forman en determinada memoria es escasa.

3. Justificación

El aprendizaje y la memoria son los principales medios de adaptación de los seres vivos. El llegar a entender los mecanismos por los cuales se llevan a cabo dichos procesos es de suma importancia para poder esclarecer un poco más sobre cualquier alteración que pueda estarse llevando a cabo en estos procesos y de esta manera poder evitarlos, prevenirlos o, llegado el caso, tratarlos. La función de los iGluR's en el aprendizaje y la memoria no está totalmente esclarecida y es para esto que se determinarán las alteraciones en el hipocampo y en la conducta de la rata producidas por antagonistas específicos de los iGluR's en una etapa temprana (DP1-DP15). Esto con el fin de determinar qué tipo de espinas se forman al antagonizar los iGluR's y evaluar el aprendizaje y la memoria de los animales para ligarlos a los cambios morfológicos neuronales.

4. Hipótesis

La administración crónica de antagonistas específicos de los NMDAR's, AMPAR's y de los KAR's produce en los tres casos una disminución del aprendizaje y de la memoria. Así mismo induce una alteración en la formación de los tipos de espinas dendríticas del hipocampo dorsal CA1, evitando su maduración. Esto, a su vez, se reflejará en una disminución de la expresión tanto de actina (proteína relacionada con la modificación del citoesqueleto), como de sinaptofisina (proteína relacionada con la sinapsis) y con una alteración en la expresión de GFAP de las células gliales, en 3 de las principales áreas que tienen que ver con la correcta comunicación en el hipocampo: CA1, CA3 y el DG.

5. Objetivo general

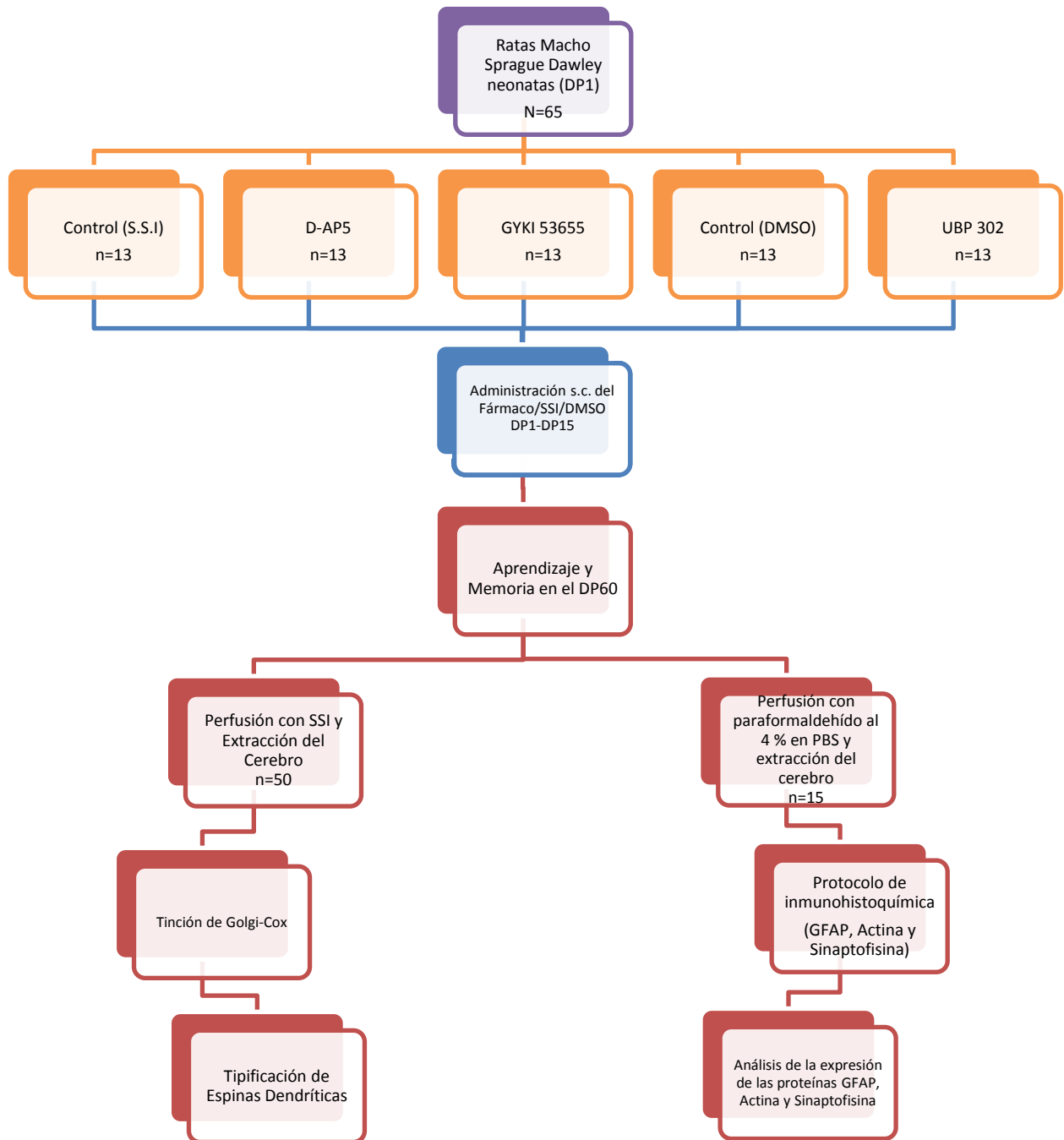
Evaluar el efecto de la administración crónica de antagonistas específicos de los NMDAR's, de los AMPAR's y de los KAR's en la etapa neonatal (DP1-DP15), sobre el aprendizaje y la memoria, en los tipos de espinas dendríticas del hipocampo dorsal CA1 y en la expresión de las proteínas GFAP, actina y sinaptofisina de las neuronas del hipocampo CA1, CA3 y DG de ratas macho.

5.1 Objetivos particulares

Para la etapa neonatal (DP1-DP15):

- Realizar la administración sistémica vía subcutánea (s.c.) desde el DP1 hasta el DP15 de los siguientes:
 - D-AP5 (antagonista específico para NMDAR's)
 - GYKI 53655 (antagonista específico para AMPAR's)
 - UBP302 (antagonista específico para KAR's)
- Evaluar el efecto de la administración de estos antagonistas en el aprendizaje y memoria de los animales en el DP60 con la prueba NOR
 - Analizar el efecto de la administración de los antagonistas en las neuronas del hipocampo CA1
 - Específicamente en los tipos de espinas dendríticas
- Evaluar el efecto de la administración de los antagonistas a los iGluR's de CA1, CA3 y DG en la expresión de las proteínas:
 - GFAP
 - Actina
 - Sinaptofisina

6. Diagrama de trabajo



7. Desarrollo experimental

7.1 Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague Dawley, proporcionadas por el Bioterio “Claude Bernard”, de dos diferentes edades: DP1 (edad neonatal) y ratas de edad adulta de 300-350 gramos (DP90 aproximadamente). Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales de acrílico transparente, con libre acceso de agua y alimento, con 12 horas luz/oscuridad a 24° C. El uso y el cuidado de los animales se realizó con lo establecido en la norma 062-ZOO-1999, a los ordenamientos de la guía National Research Council (NRC) y al comité de investigación de uso de animales de laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

7.2 Procedimiento

Las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio Claude Bernard y se esperó a que cumplieran la edad respectiva para cada protocolo de trabajo, seleccionando las ratas al azar para formar los distintos grupos.

Para el protocolo que corresponde a la etapa neonatal se comenzó la administración crónica de los fármacos o de las soluciones controles (solución salina isotónica, SSI, o dimetil sulfóxido, DMSO), dependiendo del grupo que se trate:

Etapa neonatal. Administración crónica (s.c.)				
Grupo 1. Control (SSI) n=13	Grupo 2. D-AP5 n=13	Grupo 3. GYKI 53655 n=13	Grupo 4. Control (DMSO) n=13	Grupo 5. UBP-302 n=13

Dicha administración fue durante 15 días, esto es a partir del DP1 al DP15, que es en dónde se encuentran más expresados los iGluRs en el hipocampo de la rata [Ritter y cols., 2002]. La dosis que se utilizó fue de 3 mg/Kg de peso (dosis máxima que ocupan al administrar de manera subcutánea al GYKI 52466, un antagonista de los AMPAR's) [Kumar, 2012]. Una vez terminados los 15 días de tratamiento se esperó a que cumplieran la edad adulta (DP60) y fue en esta etapa donde se evaluó el aprendizaje, la memoria y el tipo de espinas formadas en cada grupo.

7.3 Prueba conductual de reconocimiento de objetos (NOR)

La NOR se realizó en una caja de actividad motora a campo abierto y se evaluó el tiempo que le dedicó cada animal a dos objetos diferentes colocados en medio de la caja motora; esto se realizó en tres días diferentes de la siguiente manera:

1. El primer día consistió en colocar al animal en una caja de actividad motora y se grabó durante 10 minutos para posteriormente evaluar la actividad motora a campo abierto. Cabe resaltar que dicha evaluación aún está en proceso.

2. En el segundo día se colocó el animal en la caja de actividad motora junto con dos objetos equidistantes (objeto A y objeto B) y se grabó durante 6 minutos. Dos horas después se colocó de nuevo al animal en la caja de actividad motora, dejando al objeto A y cambiando el objeto B por otro (objeto C), también se grabó durante 6 minutos. Ésta es la exposición al 1er objeto novedoso (el objeto C).
3. En el tercer día (24 horas después de la exposición al 1er objeto novedoso) se colocó nuevamente al animal en la caja de actividad motora, dejando constante el objeto A y cambiando el objeto C por otro (objeto D), se grabó durante 6 minutos. Ésta es la exposición al segundo objeto novedoso (objeto D).

Una vez obtenidas las grabaciones se procedió a evaluar el tiempo que le dedicó cada animal de los grupos tratados con los antagonistas de los iGluRs a cada objeto (tiempo de reconocimiento), además se evaluó el índice de discriminación de cada animal por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de discriminación} = \frac{\text{tiempo del objeto novedoso}}{[\text{tiempo del objeto novedoso} + \text{tiempo del objeto constante}]}$$

7.4 Perfusión

La perfusión (con SSI o con paraformaldehído al 4% en PBS) se realizó inmediatamente después de terminar el último día de la prueba NOR; se anestesió al animal con pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/Kg, una vez anestesiado el animal se procedió a diseccionar el diafragma y dejar expuesto el corazón, posteriormente se cortó la aorta inferior (para que la sangre empezara a drenar) y se puncionó el ventrículo izquierdo con una jeringa, previamente suministrada con solución salina al 0.9% para los animales a ocupar en la tipificación de espinas (50 animales) o con paraformaldehído al 4% en PBS para los animales a utilizar en las inmunohistoquímicas (15 animales), y se comenzó a administrar la solución a través del ventrículo izquierdo; la perfusión terminó cuando dejó de drenar la sangre y los ojos, así como los pulmones, se observaron totalmente claros. Esto se realizó con el fin de preservar y obtener el cerebro de la rata lo más limpio posible, sin restos de eritrocitos, ya que esto dificulta la posterior observación al microscopio de los cortes cerebrales.

7.5 Obtención de la muestra

Una vez terminada la perfusión se procedió con la extracción del cerebro. Los cerebros obtenidos con SSI se colocaron en un frasco con solución de Golgi-Cox durante 15 días; posterior a esto se pasaron las muestras a una solución de sacarosa al 30% durante tres días. Una vez que los cerebros se hubieron teñido con la solución de Golgi-Cox y pasaron los 3

días en la solución de sacarosa, se procedió a realizar los cortes histológicos de manera coronal con ayuda de un vibratomo; los cortes se hicieron de 200 μm de grosor y se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados. Ya cortados los cerebros se continuó con el revelado, sometiendo a los portaobjetos con los cortes histológicos al tren de revelado (Tabla 2).

Tabla 2. Tren de revelado para la tinción de Golgi-Cox.

Tren de revelado	Tiempo (min.)
Hidróxido de amonio	30
Lavado con agua destilada	1
Fijador (revelador rápido de Kodak®)	30
Lavado con agua destilada	1
Deshidratado en etanol al 75%	1
Deshidratado en etanol al 90%	1
Deshidratado en etanol al 100%	5
Deshidratado en etanol al 100%	5
Deshidratado y aclaramiento en Xileno	15

7.6 Densidad y tipificación de espinas

Una vez obtenidos los cortes cerebrales teñidos con Golgi-Cox se procedió a realizar la tipificación de espinas, para la cual se procedió a observar las laminillas con el objetivo de 100x. Se hizo el conteo de las espinas dendríticas distales (10 μm de la porción más distal de la dendrita) para la evaluación de la densidad de espinas dendríticas, posteriormente se realizó un conteo de 100 espinas dendríticas por cada neurona y éstas fueron clasificadas de acuerdo al tipo de espinas encontradas: Espina tipo hongo, delgada, gruesa, bifurcada y sin clasificar (esta última clasificación se coloca puesto que hay ocasiones en las que a causa de la tinción no es posible diferenciar una espina en alguno de los 4 tipos).

7.7 Preparación de los tejidos cerebrales para las técnicas histológicas

Los cerebros obtenidos con paraformaldehído al 4 % se colocaron en un frasco con formaldehído durante 48 horas para después iniciar el proceso de deshidratación, aclaración, infiltración e inclusión en parafina. En el proceso de deshidratación los cerebros se colocaron durante una hora en agua destilada y posteriormente en porcentajes crecientes de etanol (al 70, 80, 90 y 100 %). La aclaración de los cerebros se desarrolló con soluciones de etanol-xileno (50-50 %) y xileno (100 %), una hora por cada solución. En la etapa de infiltración, los cerebros se colocaron en parafina líquida a 48° C durante dos horas y finalmente los tejidos se incluyeron en bloques de parafina (Leica), en los cuales se localizó la zona de la inyección y con ayuda de un micrótopo (Histocut Reichter-Jung) se realizaron cortes coronales de 7 μm de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos previamente cubiertos de polilisina.

7.8 Técnica de inmunofluorescencia

Los tejidos adheridos a los portaobjetos se sometieron al desparafinado con xilol y rehidratado con etanol en porcentajes decrecientes (100, 96 y 80 %) hasta llegar al agua destilada. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con PBS pH 7.4 por cinco minutos y delimitados con plumón hidrofóbico (ImmEdge). Posteriormente, los tejidos se bloquearon con albúmina sérica de bovino (ASB) libre de IgGs (Sigma) al 2 % en PBS durante treinta minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y después se permearon con Tritón X - 100 al 0.2 % en PBS durante diez minutos. En la siguiente etapa, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Los anticuerpos que se utilizaron fueron: anti-GFAP de conejo (Dako) (1: 100); anti-Actina de conejo (Santa Cruz biotechnology) (1:500) y anti-Sinaptofisina de cabra (Santa Cruz biotechnology) (1:100), por separado.

Para la inmunodetección indirecta se utilizaron anticuerpos secundarios bioespecíficos conjugados con fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) de cabra (492-518 nm) (para el caso del GFAP y de la actina) o con Lisamina-Rodamina de cabra (540-570 nm) (para el caso de la sinaptofisina) (Jackson Immuno Research) (todos a 1: 100), durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegidos de la luz. Finalmente, las preparaciones se montaron con medio Vecta-Shield conjugado con DAPI (2,4-diamino-2-fenilindol) (358-461 nm), un marcador fluorescente que se une a secuencias del DNA, en un cuarto oscuro. Las observaciones y el análisis de la inmunorreactividad de los anticuerpos en la región CA1, CA3 y DG del hipocampo dorsal se realizaron en un microscopio acoplado a una lámpara de mercurio y con los filtros: rojo, azul y verde (Leica®, DM/LS). El registro de las imágenes observadas se capturó por medio de una cámara digital (DFC – 300 FX) Leica®, acoplada al microscopio y por medio del objetivo de 20 y 40x. Las microfotografías obtenidas en formato JPEG, del software IM1000, se almacenaron y posteriormente se analizaron. El número de píxeles de la región CA1, CA3 y DG del hipocampo dorsal fue contado por cada rata (se utilizaron tres cortes seriados) por medio de imágenes capturadas con la cámara digital Leica® con el objetivo de 20x (para el DG) y de 40x (para CA1 y CA3) y usando el software Image – J 64.

7.9 Estadística

Para evaluar el índice de discriminación y la densidad de espinas dendríticas, se realizó una “t” de Student. Para evaluar el tiempo de reconocimiento se realizó una ANOVA de dos vías teniendo como variables independientes la administración del antagonista y el tiempo dedicado a cada objeto; mientras que para evaluar los tipos de espinas dendríticas se realizó también una ANOVA de dos vías pero teniendo en este caso como variables independientes el tipo de espina y la administración del antagonista. Finalmente para evaluar la expresión de las proteínas GFAP, actina y sinaptofisina, se utilizó el programa Image-J 64 para obtener los píxeles promedio de cada microfotografía; los píxeles se cuantificaron por campo de 20x (2000 μm^2) para el caso del DG y de 40x (200 μm^2) para el caso de CA1 y CA3.

8. Resultados

8.1 Efecto de la administración crónica de antagonistas específicos para los iGluRs en la etapa neonatal

8.1.1 Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)

Se evaluó el tiempo de reconocimiento, es decir el tiempo que le dedicó cada animal a cada objeto y el índice de discriminación para cada animal (con una $n=10$ para todos los grupos: SSI, D-AP5, GYKI, DMSO y UBP302), los animales se evaluaron cuando cumplieron la edad adulta (DP60). Se aplicó una ANOVA de dos vías para comparar cada grupo con su respectivo control tomando una $P < 0.05$ como significativa.

El efecto de la administración crónica de los antagonistas a iGluR's en el tiempo de reconocimiento a los 2 primeros objetos se muestra en la **Figura 6** para el grupo D-AP5, GYKI y UBP.

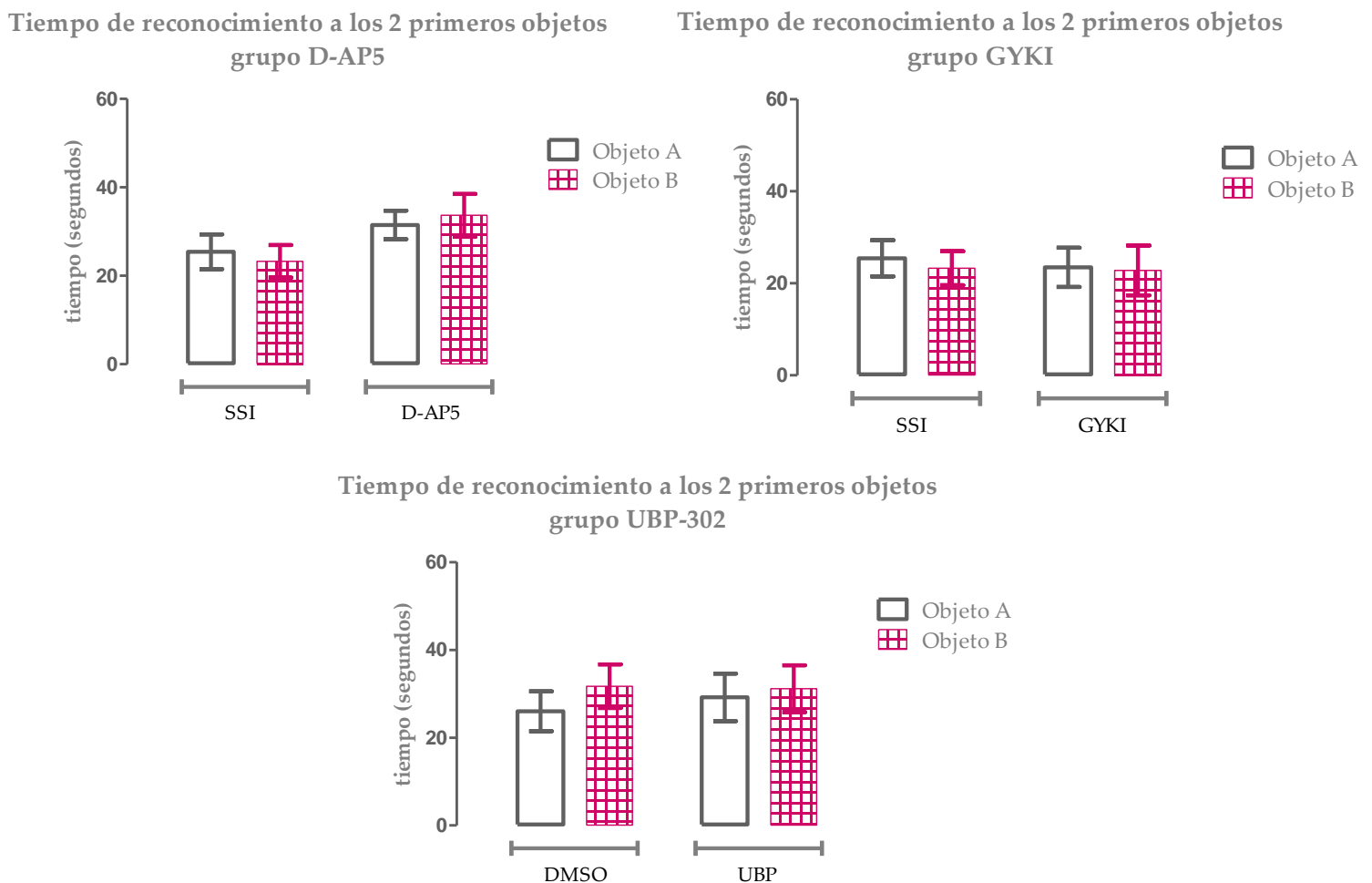


Figura 6. Tiempo de reconocimiento a los 2 primeros objetos del grupo D-AP5, GYKI y UBP. Se muestra el tiempo (en segundos) que le dedica cada grupo a cada uno de los 2 primeros objetos a los que fueron expuestos por primera vez: el objeto A (objeto que será constante durante toda la prueba) y el objeto B; una ANOVA de dos vías no mostró diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto a sus controles.

El efecto que tuvo la administración crónica de los antagonistas a iGluR's en el tiempo de reconocimiento al primer objeto novedoso se muestra en la **Figura 7** para los tres grupos.

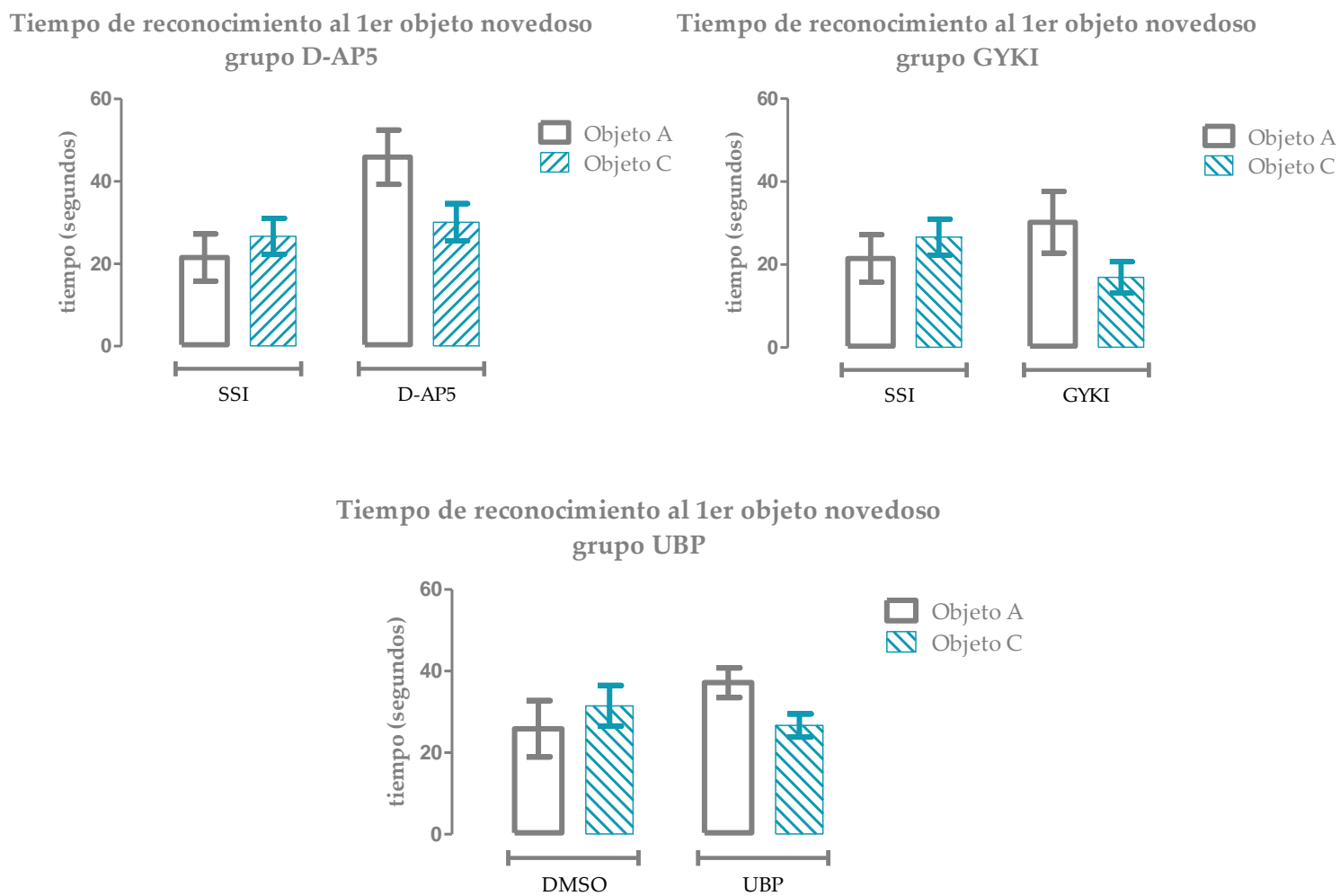


Figura 7. Tiempo de reconocimiento al primer objeto novedoso del grupo D-AP5, GYKI y UBP. Se muestra el tiempo (en segundos) que le dedica cada grupo a cada objeto, el objeto constante ya conocido (objeto A) y el primer objeto novedoso (objeto C); una ANOVA de dos vías no mostró diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto a sus controles.

Así mismo, el efecto de la administración crónica de los antagonistas a iGluR's en el tiempo de reconocimiento al segundo objeto novedoso se muestra en la **Figura 8** para el grupo D-AP5, GYKI y UBP.

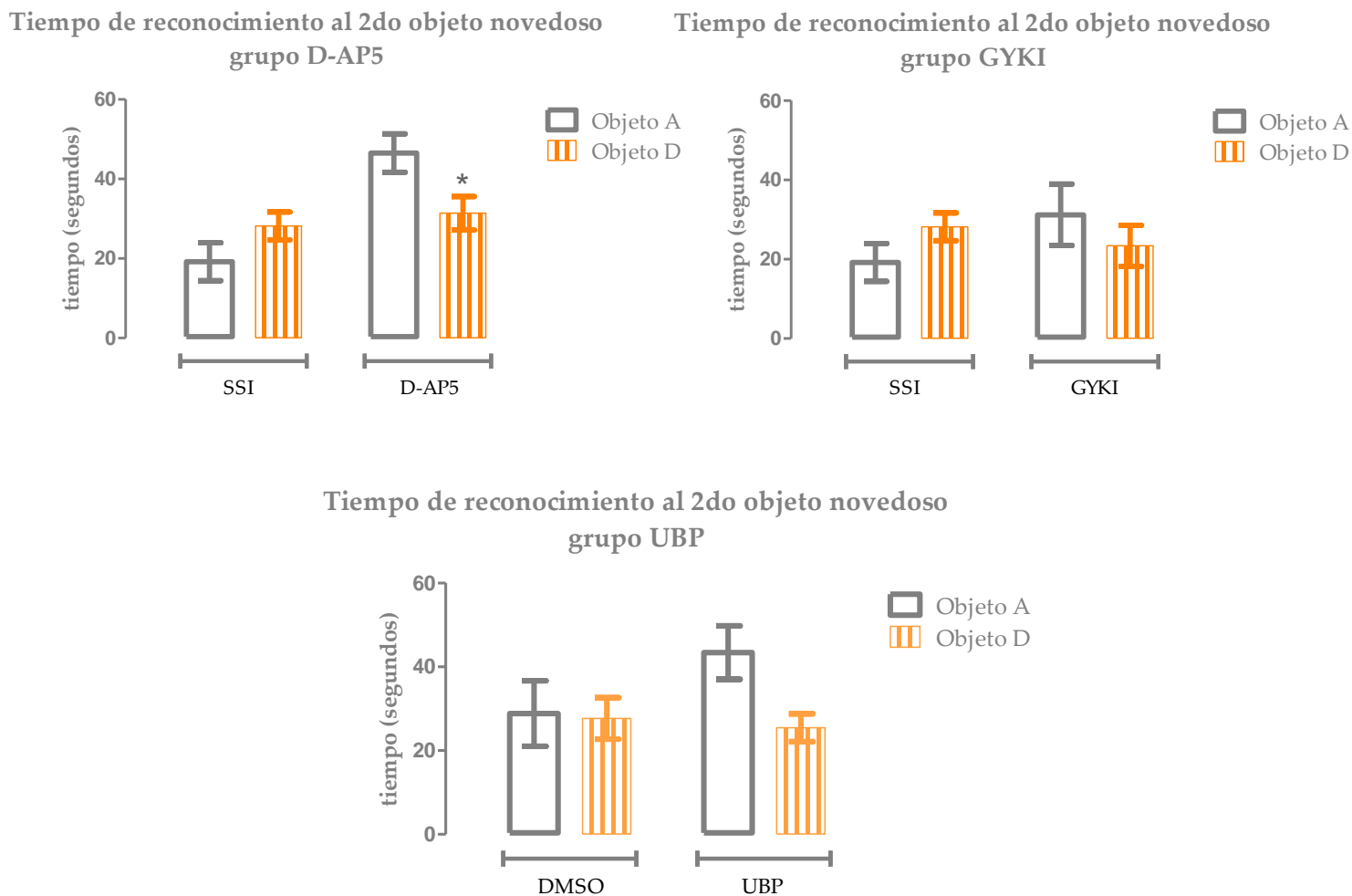


Figura 8. Tiempo de reconocimiento al segundo objeto novedoso del grupo D-AP5, GYKI y UBP. Se muestra el tiempo (en segundos) que le dedica cada grupo a cada objeto, el objeto constante ya conocido (objeto A) y el segundo objeto novedoso (objeto D); una ANOVA de dos vías no mostró diferencia significativa entre los grupos tratados con respecto a sus controles.

El índice de discriminación en la exposición a los 2 primeros objetos no se vio modificado después de la administración crónica de los antagonistas a iGluR's, esto se puede apreciar en las **Figura 9, 10 y 11**. Se aplicó una "t" de Student para comparar cada grupo con su respectivo control tomando una $P < 0.05$ como significativa.

Exposición a los 2 primeros Objetos
grupo D-AP5

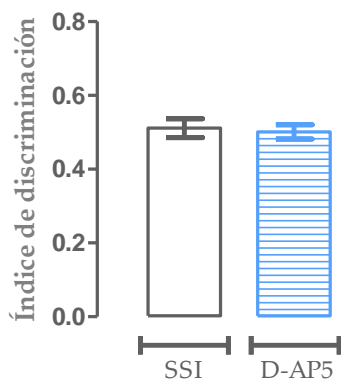


Figura 9. Exposición a los 2 primeros objetos del grupo D-AP5 (antagonista de los NMDAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" no mostró diferencia significativa.

Exposición a los 2 primeros Objetos
grupo GYKI

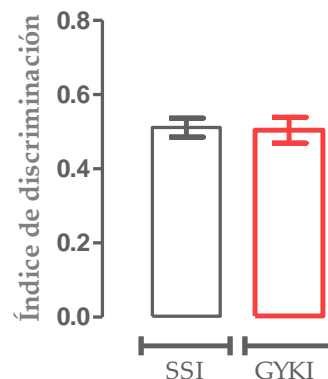


Figura 10. Exposición a los 2 primeros objetos del grupo GYKI (antagonista de los AMPAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" no mostró diferencia significativa.

Exposición a los 2 primeros Objetos
grupo UBP-302

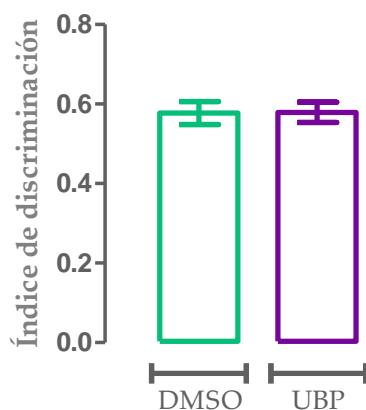


Figura 11. Exposición a los 2 primeros objetos del grupo UBP302 (antagonista de los KAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" no mostró diferencia significativa.

La administración crónica de los antagonistas a iGluR's disminuyó el índice de discriminación en la exposición al 1er objeto novedoso de los animales tratados con respecto a los controles, lo que se aprecia en las **Figura 12, 13 y 14**. Se aplicó una "t" de Student para comparar cada grupo con su respectivo control tomando una $P < 0.05$ como significativa.

Exposición al 1er objeto novedoso
grupo D-AP5

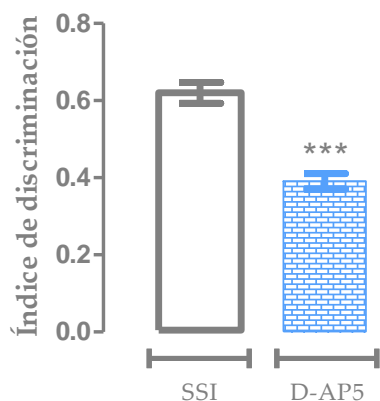


Figura 12. Exposición al primer objeto novedoso del grupo D-AP5 (antagonista de los NMDAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" mostró diferencia significativa ($***P < 0.0001$).

Exposición al 1er objeto novedoso
grupo GYKI

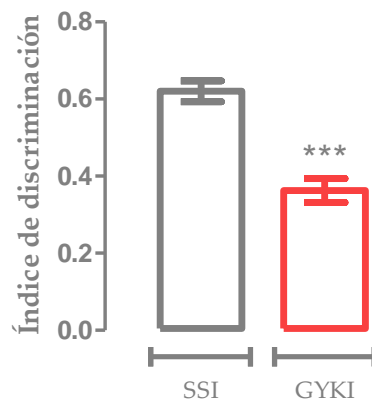


Figura 13. Exposición al primer objeto novedoso del grupo GYKI (antagonista de los AMPAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" mostró diferencia significativa ($***P < 0.0001$).

Exposición al 1er objeto novedoso
grupo UBP-302

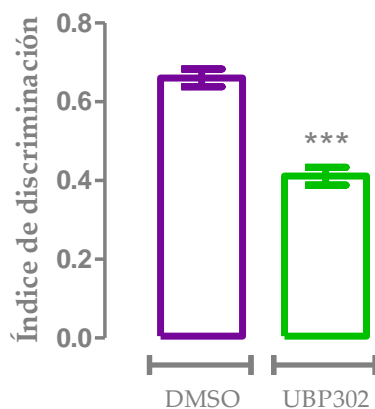


Figura 14. Exposición al primer objeto novedoso del grupo UBP302 (antagonista de los KAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" mostró diferencia significativa ($***P < 0.0001$).

Para el caso del índice de discriminación de la exposición al 2do objeto novedoso se aprecian cambios en el grupo D-AP5 con respecto a su control en la **Figura 15**, lo mismo sucede para los otros grupos que se muestran en las **Figuras 16**, y **17**.

Exposición al 2do objeto novedoso grupo D-AP5

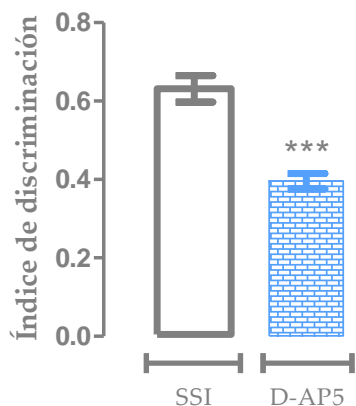


Figura 15. Exposición al segundo objeto novedoso del grupo D-AP5 (antagonista de los NMDAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" mostró diferencia significativa (** $P < 0.0001$).

Exposición al 2do objeto novedoso grupo GYKI

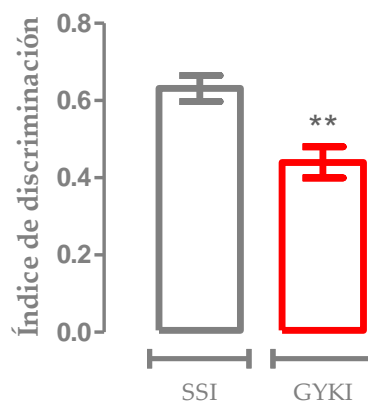


Figura 16. Exposición al segundo objeto novedoso del grupo GYKI (antagonista de los AMPAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" mostró diferencia significativa (** $P < 0.005$).

Exposición al 2do objeto novedoso grupo UBP-302

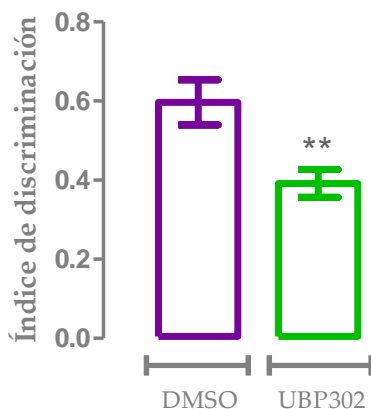


Figura 17. Exposición al segundo objeto novedoso del grupo UBP (antagonista de los KAR's). Se muestra el índice de discriminación de cada grupo; la prueba "t de Student" mostró diferencia significativa (** $P < 0.05$).

8.1.2 Densidad de espinas dendríticas

La administración crónica de los antagonistas a iGluRs disminuyó la densidad de espinas dendríticas de los animales tratados con respecto a los controles, lo que se aprecia en las **Figura 18, 19 y 20**. Se aplicó una “t” de Student para comparar cada grupo con su respectivo control tomando una $P < 0.05$ como significativa.

Densidad de espinas dendríticas del Hipocampo dorsal CA1 del grupo D-AP5 **Densidad de espinas dendríticas del Hipocampo dorsal CA1 del grupo GYKI**

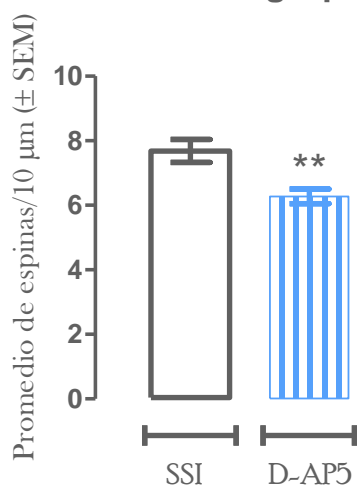


Figura 18. Densidad de espinas del hipocampo dorsal CA1 del grupo D-AP5. Se muestra el promedio de espinas de los 10 μm de la dendrita más distal; la prueba “t de Student” mostró diferencia significativa del grupo D-AP5 respecto a su control (** $P < 0.005$).

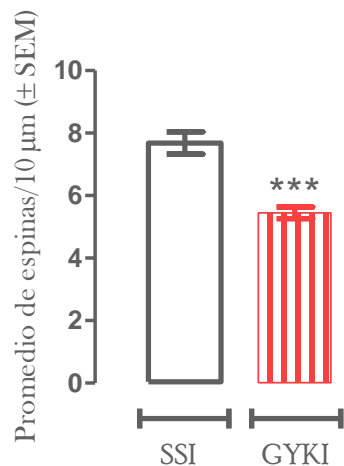


Figura 19. Densidad de espinas del hipocampo dorsal CA1 del grupo GYKI. Se muestra el promedio de espinas de los 10 μm de la dendrita más distal; la prueba “t de Student” mostró diferencia significativa del grupo GYKI respecto a su control (** $P < 0.0001$).

Densidad de espinas dendríticas del Hipocampo dorsal CA1 del grupo UBP-302

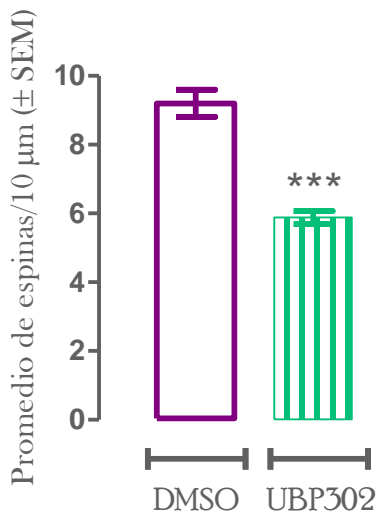


Figura 20. Densidad de espinas del hipocampo dorsal CA1 del grupo UBP. Se muestra el promedio de espinas de los 10 μm de la dendrita más distal; la prueba “t de Student” mostró diferencia significativa del grupo UBP respecto a su control (** $P < 0.0001$).

8.1.3 Tipificación de las espinas dendríticas

La administración crónica de los antagonistas a iGluR's altero los tipos de espinas dendríticas de los animales tratados con respecto a los controles, lo que se aprecia en las **Figura 21, 22 y 23**. Se aplicó una ANOVA de dos vías para comparar cada grupo con su respectivo control tomando una $P < 0.05$ como significativa.

El efecto de la administración crónica de los antagonistas a iGluRs en los tipos de espinas dendríticas se muestra en la **Figura 21** para el grupo D-AP5; mientras que el efecto de la administración del GYKI sobre los tipos de espinas aparece en la **Figura 22**; de la misma manera la administración del UBP provocó alteraciones en los tipos de espinas dendríticas, lo que se aprecia en la **Figura 23**.

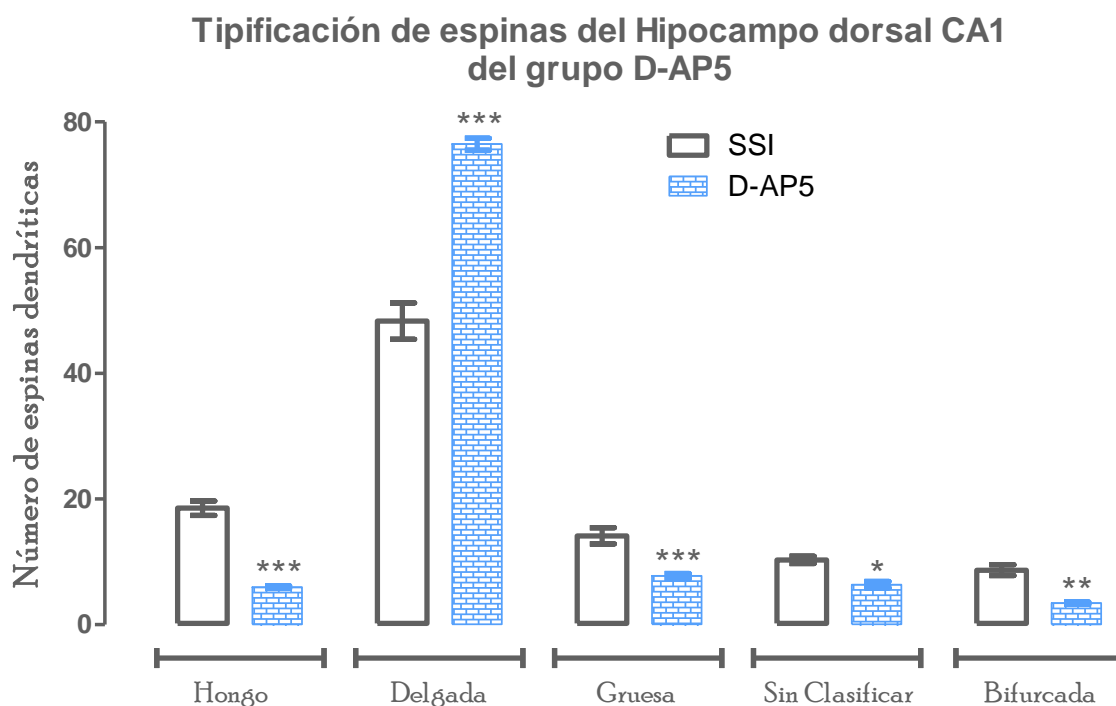


Figura 21. Tipificación de las espinas dendríticas del hipocampo dorsal CA1 del grupo D-AP5. Se muestra el número de espinas de cada grupo para cada tipo de espina: hongo, delgada, gruesa, sin clasificar y bifurcada; una prueba ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas del grupo D-AP5 respecto a su control ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$).

Tipificación de espinas del Hipocampo dorsal CA1 del grupo GYKI 53655

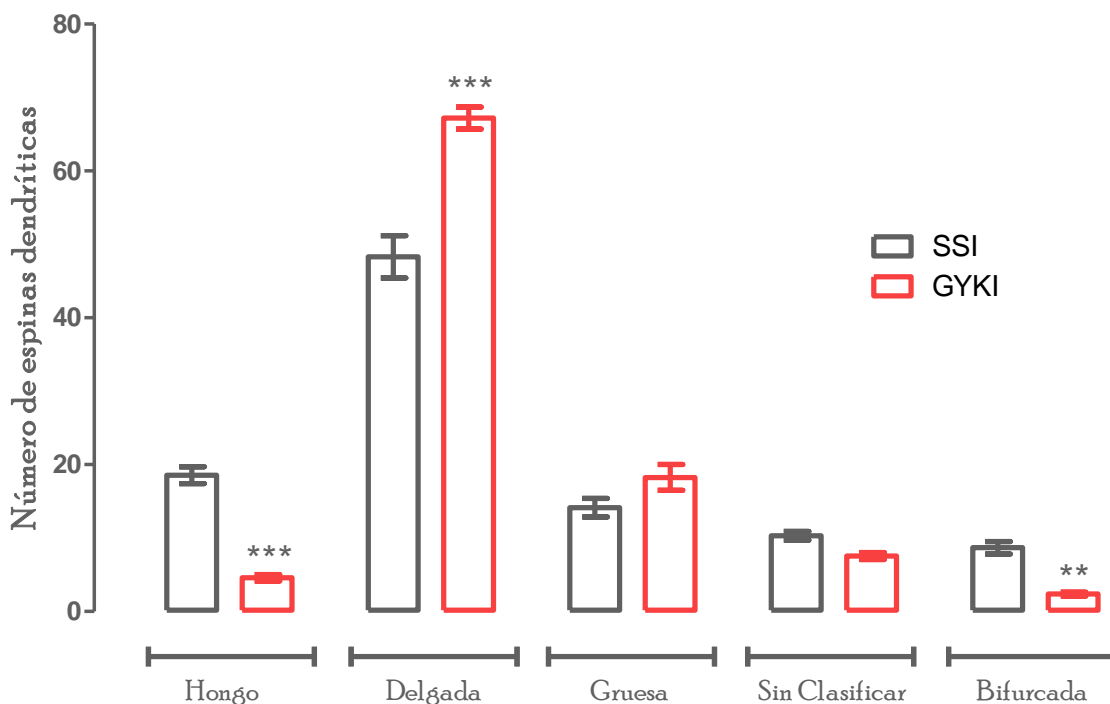


Figura 22. Tipificación de las espinas dendríticas del hipocampo dorsal CA1 del grupo GYKI. Se muestra el número de espinas de cada grupo para cada tipo de espina: hongo, delgada, gruesa, sin clasificar y bifurcada; una prueba ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas del grupo GYKI respecto a su control (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Tipificación de espinas del Hipocampo dorsal CA1 del grupo UBP-302

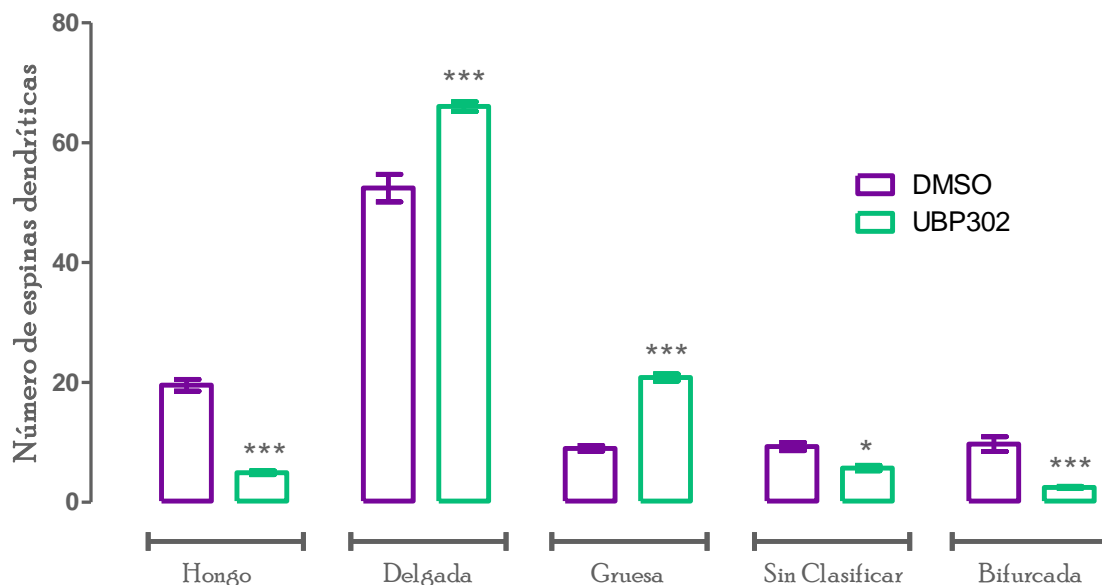


Figura 23. Tipificación de las espinas dendríticas del hipocampo dorsal CA1 del grupo UBP-302. Se muestra el número de espinas de cada grupo para cada tipo de espina: hongo, delgada, gruesa, sin clasificar y bifurcada; una prueba ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas del grupo UBP-302 respecto a su control (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

8.1.4 Expresión de GFAP, actina y sinaptofisina

La administración crónica de los antagonistas a iGluR's no induce la expresión de la proteína *GFAP* en el hipocampo CA1, CA3 y DG de los animales de todos los grupos, pero sí disminuye la expresión de *actina* y *sinaptofisina* en la región CA1, CA3 y DG de los grupos tratados con respecto a sus controles, esto se puede apreciar en las **Figuras 24-35**. Se aplicó una ANOVA de dos vías para comparar cada grupo con su respectivo control tomando una $P < 0.05$ como significativa.

Podemos observar en la **Figura 24-1 A, B, C, D, E** y en la **Figura 25**, que la administración crónica de los antagonistas no induce la expresión de *GFAP* en CA1 de todos los grupos. Así mismo podemos apreciar en la **Figura 24-2 A, B, C, D, E**, en la **Figura 26**, en la **Figura 24-3 A, B, C, D, E** y en la **Figura 27**, que la administración de los antagonistas disminuye la expresión tanto de *actina* como de *sinaptofisina* en el hipocampo dorsal CA1.

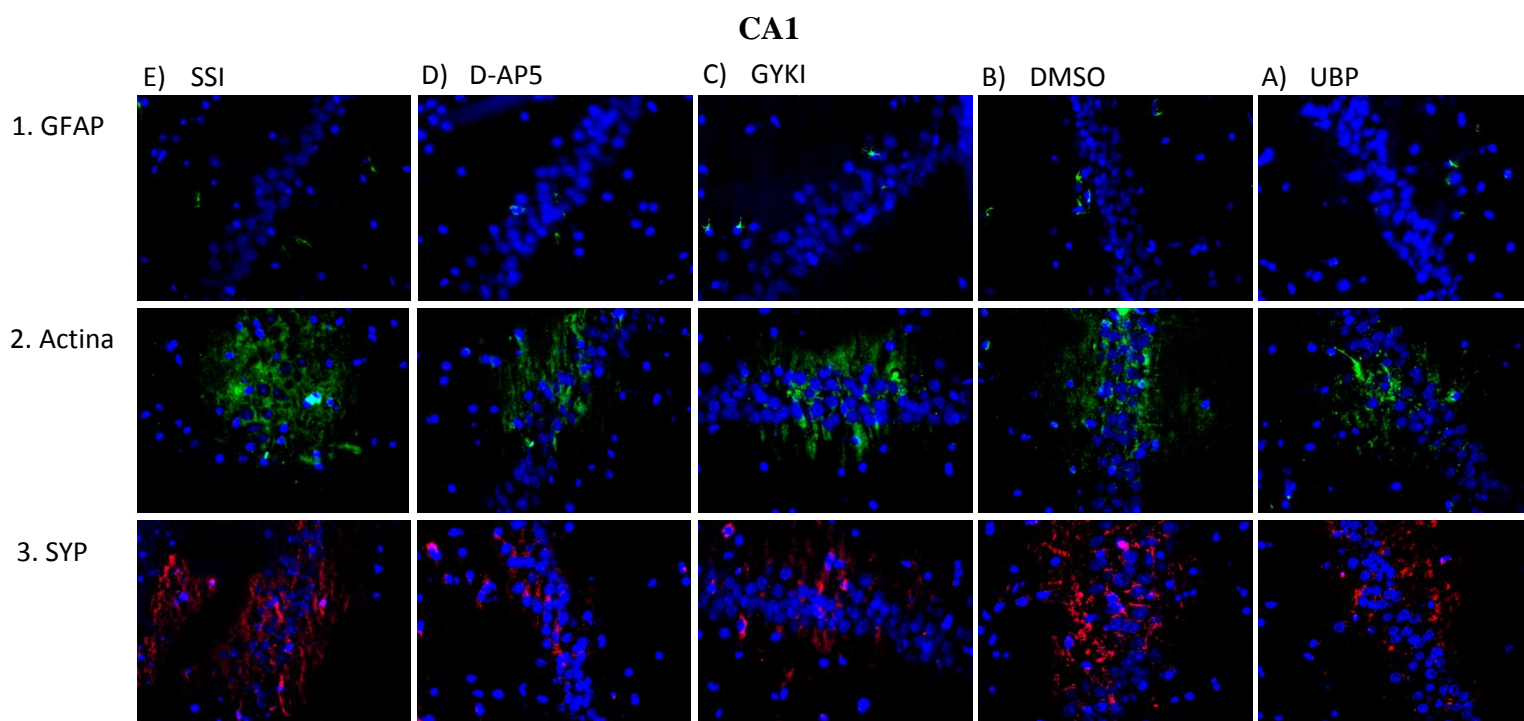


Figura 24. Expresión de las proteínas GFAP (1), Actina (2) y Sinaptofisina (3) en el hipocampo dorsal CA1 de los grupos A) SSI, B) D-AP5, C) GYKI, D) DMSO y E) UBP. Las microfotografías muestran la inmunorreactividad para GFAP (verde), Actina (verde), Sinaptofisina (rojo) y DAPI (azul) en el hipocampo CA1, se muestra la expresión de cada proteína para cada grupo.

Expresión de GFAP en CA1

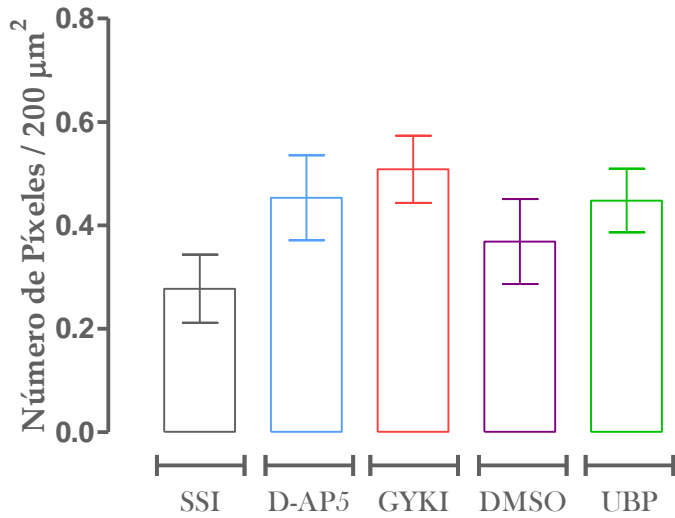


Figura 25. Expresión de GFAP en el hipocampo dorsal CA1. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de GFAP por cada 200 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA no mostró diferencia significativa.

Expresión de Actina en CA1

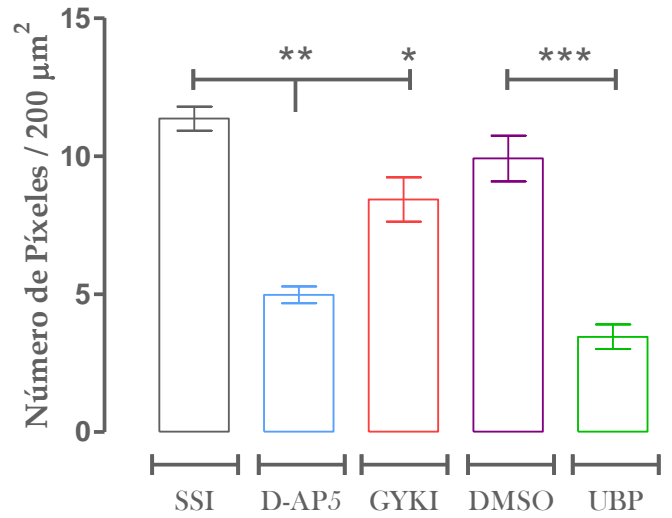


Figura 26. Expresión de Actina en el hipocampo dorsal CA1. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de Actina por cada 200 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA mostró diferencia significativa de los grupos tratados respecto a sus controles (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Expresión de Sinaptofisina en CA1

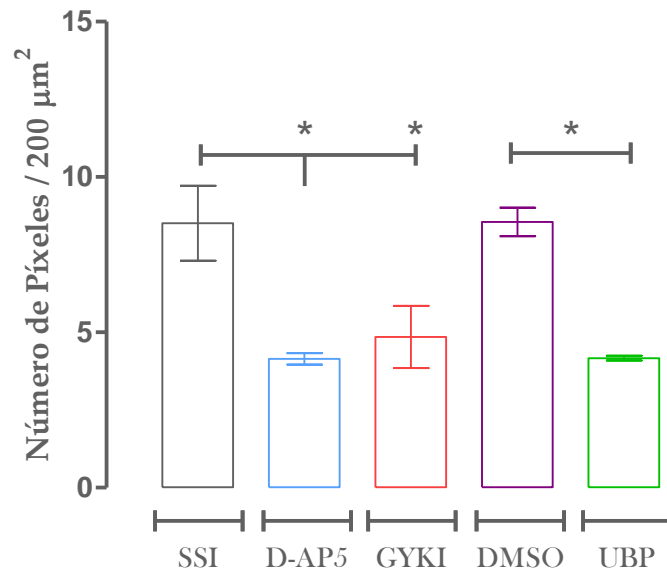


Figura 27. Expresión de Sinaptofisina en el hipocampo dorsal CA1. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de Sinaptofisina por cada 200 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA mostró diferencia significativa de los grupos tratados respecto a sus controles (* $P < 0.05$).

La administración crónica de los antagonistas no induce la expresión de *GFAP* en el hipocampo dorsal CA3 de todos los grupos, lo que se aprecia en las **Figuras 28-1 A, B, C, D, E** y en la **Figura 29**. De la misma manera los resultados no mostraron una diferencia significativa en la expresión de *actina* de los grupos tratados con respecto a sus controles en el hipocampo dorsal CA3, esto se aprecia en las **Figuras 28-2 A, B, C, D, E** y en la **Figura 30**; sin embargo se puede apreciar una clara tendencia de los grupos experimentales a disminuir la expresión de *actina*. Por otra parte se puede observar en las **Figuras 28-3 A, B, C, D, E** y en la **Figura 31**, que los grupos tratados con los antagonistas a los iGluR's tienen una disminución en la expresión de la *sinaptofisina*.

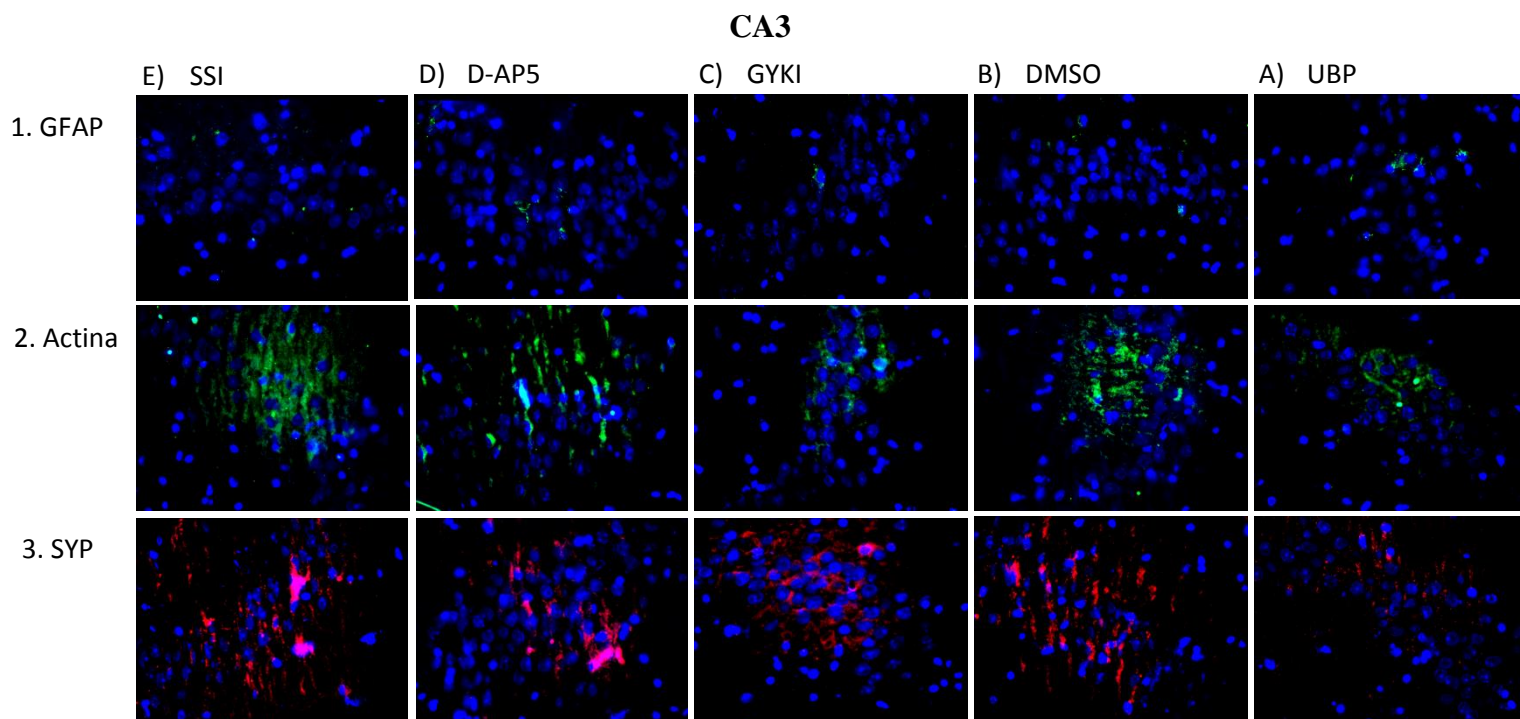


Figura 28. Expresión de las proteínas GFAP (1), Actina (2) y Sinaptofisina (3) en el hipocampo dorsal CA3 de los grupos A) SSI, B) D-AP5, C) GYKI, D) DMSO y E) UBP. Las microfotografías muestran la inmunoreactividad para GFAP (verde), Actina (verde), Sinaptofisina (rojo) y DAPI (azul) en el hipocampo CA3, se muestra la expresión de cada proteína para cada grupo.

Expresión de GFAP en CA3



Figura 29. Expresión de GFAP en el hipocampo dorsal CA3. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de GFAP por cada 200 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA no mostró diferencia significativa.

Expresión de Actina en CA3

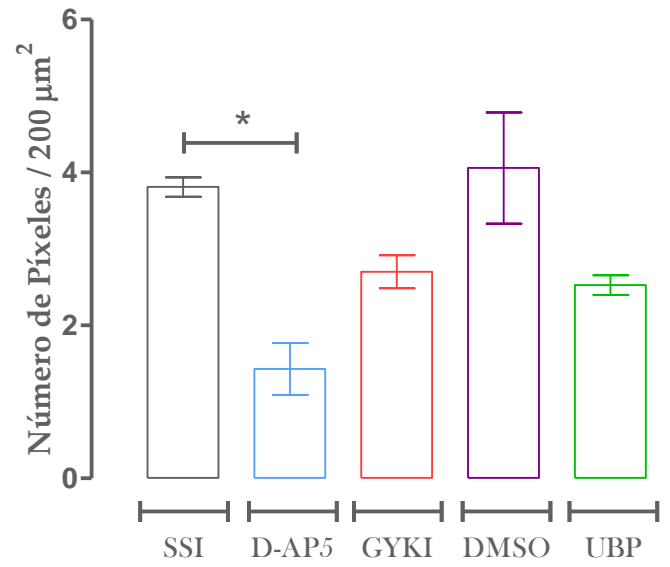


Figura 30. Expresión de Actina en el hipocampo dorsal CA3. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de Actina por cada 200 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA mostró diferencia significativa del grupo D-AP5 respecto a su control (* $P < 0.05$).

Expresión de Sinaptofisina en CA3

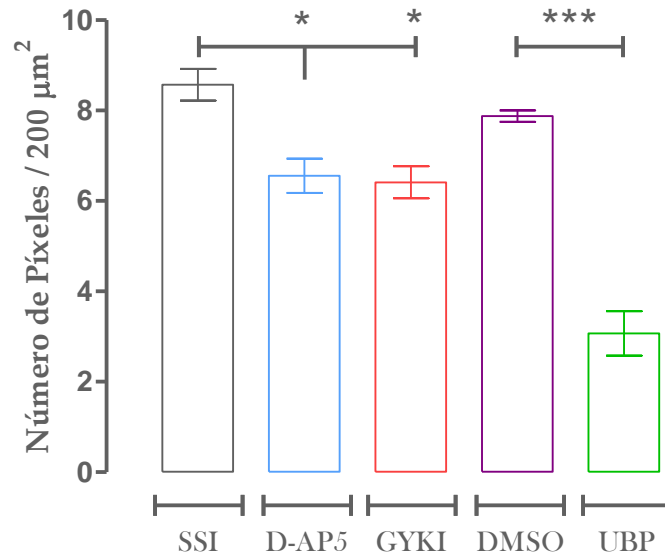


Figura 31. Expresión de Sinaptofisina en el hipocampo dorsal CA3. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de Sinaptofisina por cada 200 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA mostró diferencia significativa de los grupos tratados respecto a sus controles (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

De igual manera la administración crónica de los antagonistas a los iGluR's tampoco indujo la expresión de la proteína *GFAP* en el DG de ninguno de los grupos, lo que puede observarse en las **Figuras 32-1 A, B, C, D, E** y en la **Figura 33**. Por otra parte se observaron cambios significativos en la expresión de *actina* del DG en el grupo tratado con UBP (**Figura 32-2 E** y **Figura 34**) con respecto a su control, no así con los otros grupos; sin embargo existe una clara tendencia de los grupos tratados con los antagonistas a disminuir la expresión de *actina* (**Figuras 32-2 A, B, C, D** y **Figura 34**). Finalmente en las **Figuras 32-3 A, B, C, D, E** y en la **Figura 35**, se puede observar que el tratamiento con los antagonistas específicos a estos receptores disminuye claramente la expresión de la sinaptofisina en el DG.

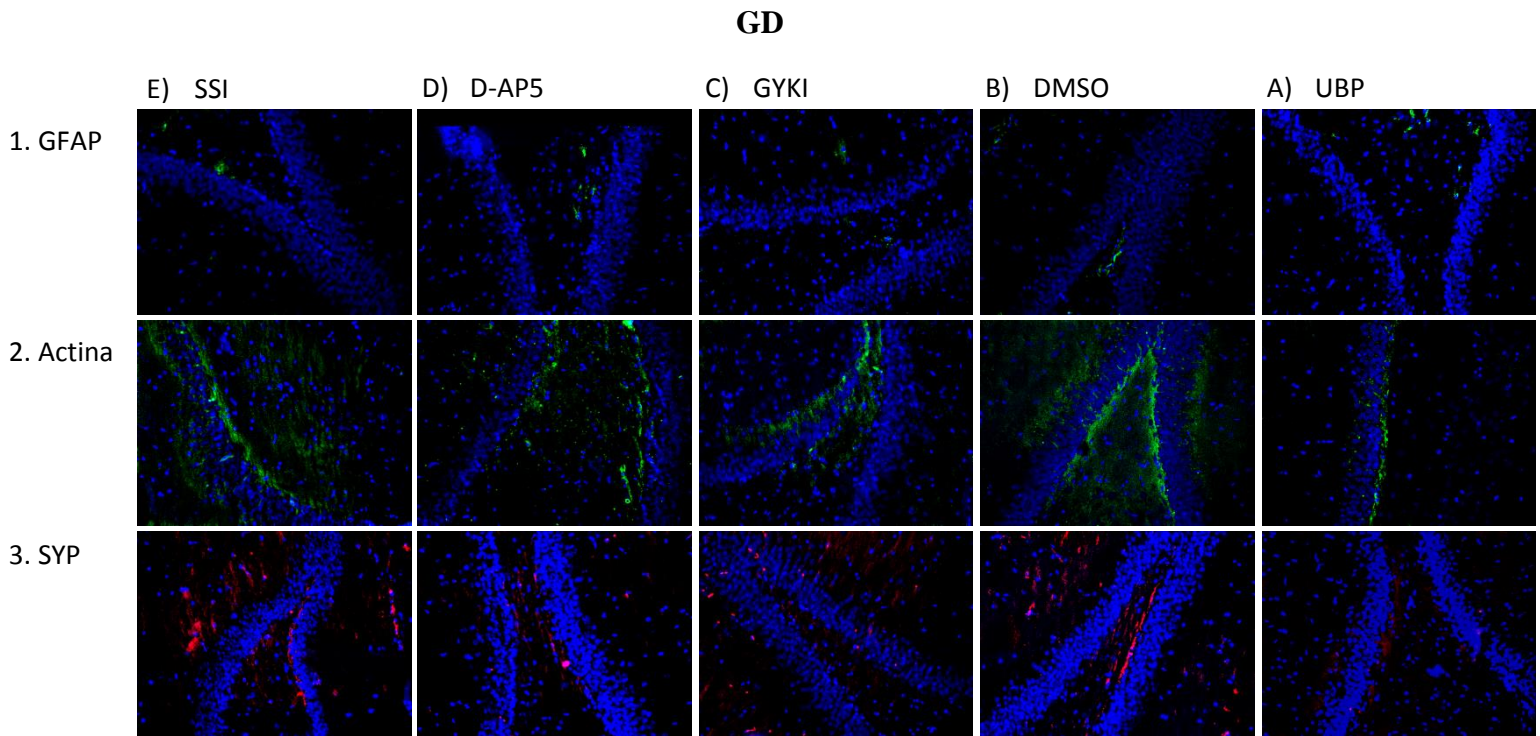


Figura 32. Expresión de las proteínas *GFAP* (1), *Actina* (2) y *Sinaptofisina* (3) en el GD de los grupos A) SSI, B) D-AP5, C) GYKI, D) DMSO y E) UBP. Las microfotografías muestran la inmunorreactividad para *GFAP* (verde), *Actina* (verde), *Sinaptofisina* (rojo) y *DAPI* (azul) en el GD, se muestra la expresión de cada proteína para cada grupo.

Expresión de GFAP en GD

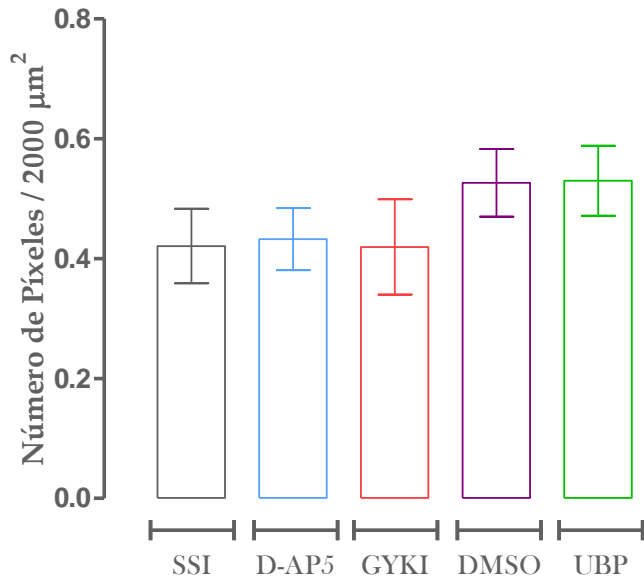


Figura 33. Expresión de GFAP en el GD. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de GFAP por cada 2000 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA no mostró diferencia significativa.

Expresión de Actina en GD

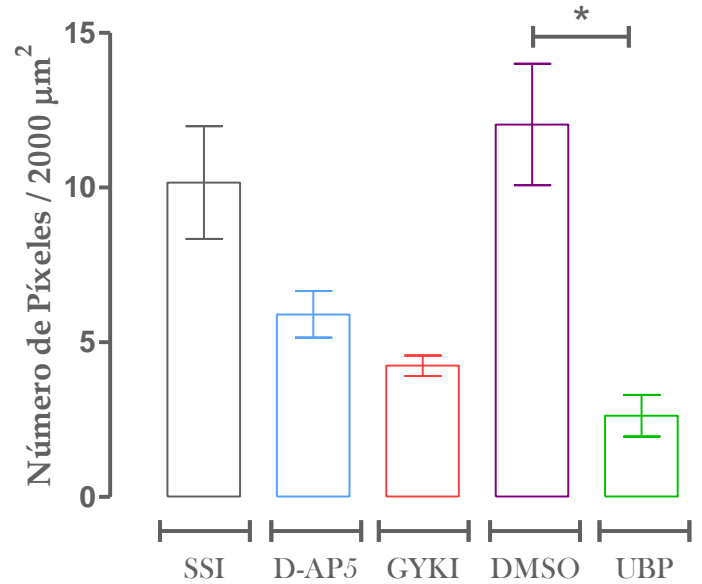


Figura 34. Expresión de Actina en el GD. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de Actina por cada 2000 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA mostró diferencia significativa del grupo UBP respecto a su control (* $P < 0.05$)

Expresión de Sinaptofisina en GD

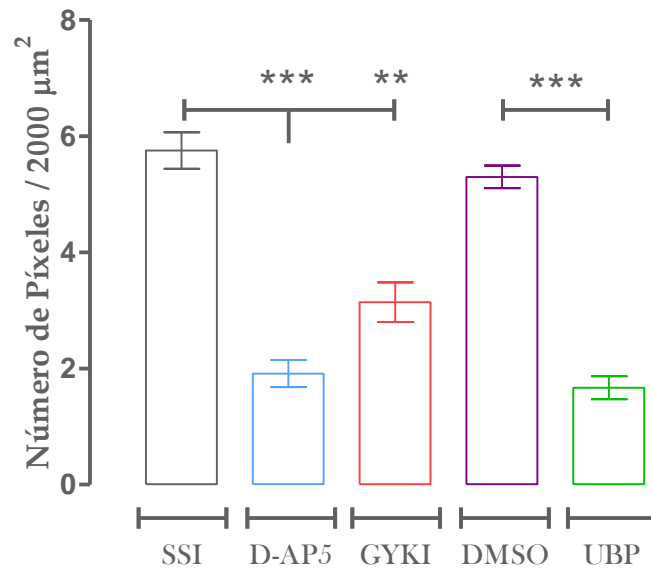


Figura 35. Expresión de Sinaptofisina en el GD. Se muestra el promedio del número de píxeles contabilizados para la expresión de Sinaptofisina por cada 2000 μm^2 para cada grupo; una prueba ANOVA mostró diferencia significativa de los grupos tratados respecto a sus controles (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

9. Discusión de los resultados

9.1 Efecto de la administración crónica de antagonistas específicos para los iGluRs en la etapa neonatal

9.1.1 Prueba de reconocimiento de objetos (NOR)

Dentro de los objetivos iniciales del presente proyecto se encuentra evaluar el efecto de la administración crónica de antagonistas específicos para los iGluR's (D-AP5 para el caso de los NMDA, GYKI-53655 para el caso de los AMPA y UBP-302 para el caso de los KA) durante una etapa crítica como lo es la etapa neonatal. Esto con el fin de observar los cambios tanto conductuales como morfológicos que suceden en los animales tratados con dichos antagonistas.

Las evaluaciones cognitivas se realizaron por medio del modelo de reconocimiento de objetos (NOR), que nos permite analizar el aprendizaje, la memoria de trabajo de tipo asociativo y la memoria a largo plazo. Se evaluaron el *tiempo de reconocimiento* (tiempo dedicado por el animal a cada objeto) y el *índice de discriminación*; si el animal le dedica tiempo al objeto novedoso y no al objeto que ya conoce (el objeto constante), el *índice de discriminación* será de “1”; mientras que si le dedica el mismo tiempo a ambos objetos el *índice de discriminación* será de “0.5”. De ésta manera se puede saber si el animal puede discriminar entre un objeto ya conocido y otro que no conoce. Así mismo estos dos aspectos, el tiempo de reconocimiento y el índice de discriminación, nos permiten evaluar la atención que le presta el animal a cada objeto [Enns, 2004; Carlini, 2011].

Para el *tiempo de reconocimiento* a los **2 primeros objetos**, se puede observar que no hubo cambios significativos del tiempo que le dedica cada grupo a cada objeto (**Figura 6**). Esto significa que los animales exploran los dos objetos que se les presentan la primera vez, dedicándole a cada objeto (el objeto A y el objeto B) el mismo tiempo en promedio.

En el caso del *tiempo de reconocimiento* al **primer objeto** novedoso, se puede observar que no hubo cambios significativos del tiempo que le dedica cada grupo a cada objeto (**Figura 7**) sin embargo se puede apreciar una tendencia de los animales experimentales a dedicarle menos tiempo al objeto novedoso, no así con los animales control. De la misma manera se puede apreciar, en el *tiempo de reconocimiento* al **segundo objeto** novedoso, una tendencia de los grupos experimentales a dedicarle menor tiempo al objeto nuevo (**Figura 8**).

No obstante el tiempo que le dedica cada animal a cada objeto puede variar mucho entre cada rata aunque pertenezcan al mismo grupo. De esta manera mientras una rata le puede dedicar 100 segundos al objeto novedoso y 50 segundos al objeto constante, otra rata puede dedicarle 20 segundos al objeto novedoso y 10 segundos al objeto constante y, aunque las dos ratas le dediquen diferente tiempo a cada objeto, el *índice de discriminación* para ambas es el mismo (es 0.66, ver la formula descrita en la página 19), es decir, la relación entre los tiempos que le dedican a cada objeto es la misma. En consecuencia se ha sugerido

que es crítico determinar el *índice de discriminación* y no sólo el *tiempo de reconocimiento* [Carlini, 2011; Antunes y Biala, 2012].

Interesantemente después de que los animales fueron sometidos a una administración crónica de los antagonistas a iGluR's, el índice de discriminación en la exposición a los **2 primeros objetos** no se vio modificado (**Figura 9, 10 y 11**). Estos resultados nos sugieren que cuando se les presentan los 2 primeros objetos a los animales (ya sean experimentales o control) al inicio de la prueba NOR, dichos animales se dedican a explorar los dos objetos (Objeto A y Objeto B) y no le dedican alguna prioridad a ninguno, puesto que estos objetos pueden considerarse, en un principio, dos estímulos novedosos y por tanto los animales dedican la misma razón de tiempo a explorar ambos objetos. Así mismo esta primera parte de la prueba nos demuestra que los animales de cada uno de los grupos no poseen ni reflejan preferencia alguna por algún lugar en específico o por un objeto; resultados que concuerdan con lo que ha sido demostrado anteriormente por Ennaceur y Delacour, 1988; Hale y Good, 2005; Baxter, 2010; Antunes y Biala, 2012.

Por otra parte la administración crónica de estos antagonistas resultó en una disminución del *índice de discriminación* del **primer objeto** novedoso para el grupo D-AP5 (**Figura 12**), para el grupo GYKI (**Figura 13**) y para el grupo UBP (**Figura 14**). Lo que nos sugiere que los animales tratados con los antagonistas específicos de iGluR's tienen alteraciones en la memoria de corto plazo de tipo asociativa [Humphreys y cols., 1999; Riddoch y Humphreys, 2001; Ward, 2006], puesto que no pueden discriminar entre las características del objeto constante y las características del nuevo. Esta evaluación se realizó dos horas después del aprendizaje durante el segundo día de la prueba, y se puede observar que los animales no pueden recordar que ya conocían un objeto (objeto A) y de esta manera aunque se coloque un objeto novedoso (objeto C) el animal no puede asociar la información que obtuvo previamente, es decir su aprendizaje se encuentra alterado [Morgado, 2005; Johansen y cols., 2011]. Para el caso de la exposición al **segundo objeto** novedoso se observa una disminución significativa del *índice de discriminación* en el grupo D-AP5 (**Figura 15**), de la misma manera para el grupo GYKI (**Figura 16**) y para el grupo UBP (**Figura 17**). Lo que sugiere que la administración de los antagonistas en la etapa neonatal puede alterar la memoria a largo plazo, puesto que la exposición al segundo objeto novedoso se realizó 24 horas después de la exposición al primer objeto novedoso. Se puede apreciar que los animales siguen sin poder discriminar entre un objeto que ha permanecido constante en tres ocasiones (objeto A) y el segundo objeto novedoso (objeto D). Además hay considerar de nuevo que, tal como lo demuestran Dere y cols., 2005; Hale y Good, 2005; Benice y cols., 2006, Williams y cols., 2007 y Burke y cols., 2010, los animales naturalmente no tienen preferencia por algún tipo de objeto en particular, así como tampoco muestran preferencia del lugar donde se coloquen los objetos y no intervienen ni el material del que estén hechos los objetos, ni el número de objetos que se utilice, simplemente los roedores tienen una habilidad innata a explorar lo novedoso.

De esta manera los resultados previos nos muestran que los animales neonatos administrados con estos antagonistas (D-AP5, GYKI y UBP302) disminuyen tanto el

tiempo de reconocimiento como el *índice de discriminación*. Podemos observar por tanto que estos antagonistas reducen tanto el proceso de aprendizaje como la memoria de corto y largo plazo. Esto probablemente porque al tratar a los neonatos con los antagonistas a los iGluR's estamos alterando la correcta sinapsis que debe ocurrir para que se lleven a cabo procesos tan complejos tales como la PLP y la DLP, procesos que se consideran el sustrato celular y molecular del aprendizaje y de la memoria [Anwyl, 1999; Kandel y cols., 2000; Kreitzer y Malenka, 2008; Citri y Malenka, 2008; Neves y cols., 2008; Butz y cols., 2009] y donde los iGluR's participan activamente, funcionando como mediadores moleculares por los cuales las espinas dendríticas pueden cambiar su morfología funcional, madurar y producir plasticidad neuronal [Lerma, 2003; Lynch, 2004; Vesikansa, 2013]. Esto finalmente repercute en la adquisición de la información y, más aún, sobre la evocación de la nueva información que es necesaria durante cada etapa de la prueba de reconocimiento de objetos [Enns, 2004; Carlini, 2011]. Lo que no ocurre con los grupos control (SSI y DMSO), que muestran un comportamiento opuesto, es decir, la información previamente adquirida es retomada para identificar el cambio de un objeto previamente conocido por uno nuevo.

9.1.2 Densidad y tipificación de las espinas dendríticas

Se evaluó la media del número de espinas dendríticas en 10 μm de la dendrita más distal del soma. La administración crónica de los antagonistas D-AP5, GYKI-53655 y UBP-302 resultó en una disminución de la densidad de las espinas dendríticas en el hipocampo dorsal CA1 de los tres grupos administrados con estos antagonistas con respecto a sus controles (**Figura 18, 19 y 20**), lo que nos sugiere que el bloqueo de los iGluR's en la etapa neonatal causa, a largo plazo, una alteración en la comunicación inter-sináptica neuronal del hipocampo dorsal. Así mismo se sabe que la forma, ramificación y extensión del árbol dendrítico, así como la cantidad de espinas dendríticas, son parámetros de la morfología neuronal que se encuentran en constante cambio debido a la influencia del medio que rodea a las neuronas y que, al evaluarlas, podemos inferir su complejidad así como la cantidad de conexiones que pudieran tener [Moser y cols., 1994; Fiala, 2008].

Teniendo en consideración lo antes mencionado, podemos inferir que una disminución en la densidad de las espinas dendríticas puede ser un indicativo de una reducida entrada sináptica a la región CA1 del hipocampo dorsal, estructura implicada en los procesos de memoria y aprendizaje [Amaral y Lavenex, 2007; Andersen y cols., 2007]. Lo cual podría explicar las alteraciones en el aprendizaje y la memoria que se observan en los grupos tratados con los iGluR's.

Aunado a lo anterior se realizó la tipificación de las espinas dendríticas del hipocampo dorsal CA1, los tipos de espinas se evaluaron de acuerdo a la clasificación de Harris y cols., 1992. Las espinas dendríticas son pequeñas salientes de la superficie dendrítica de las neuronas que muestran una dinámica notable en cuanto a su formación, eliminación y plasticidad, esto gracias a determinadas características moleculares que poseen las espinas dendríticas y las cuales determinan su estructura, maduración y funcionalidad [Silva-

Gómez y cols., 2003; Alquicer y cols., 2008; 2008; Bourne y Harris, 2008; Citri y Malenka]. Una de dichas características es la estructura de especialización denominada densidad postsináptica, en ésta estructura coocurre un ensamble molecular que incluyen a diversas proteínas (400-500 proteínas) entre las que se encuentran cinasas, como la PKA, Ca^{2+} /calmodulina, fosfatasa, componentes del citoesqueleto, proteínas implicadas en el tráfico de la membrana y canales iónicos, entre los que destacan los iGluR's (NMDA, AMPA y KA), ya que estos receptores son los que participan en la regulación de la eficiencia sináptica, así como en el mantenimiento y maduración de las espinas dendríticas [Alvarez y Sabatini, 2007; Yao y cols., 2008]. Para que una espina dendrítica madure debe pasar por diferentes etapas, las cuales se diferencian en forma, tamaño y complejidad. En el hipocampo adulto existe un 65% de las espinas tipo delgada y el 25% llegan a ser de tipo hongo (las cuales tienen un diámetro de cabeza de 0.6 mm), mientras que el porcentaje restante lo componen las espinas de tipo gruesas y bifurcadas [Harris y cols., 1992; Harris, 1999; Harris y cols., 2003].

La primera espina en formarse es la espina delgada, éste tipo de espina se considera una espina inmadura. Las espinas delgadas se forman o desaparecen relativamente rápido en respuesta a diferentes niveles de actividad sináptica y se caracteriza por tener una DPS menor, comparada con los otros tipos de espinas dendríticas [Zuo y cols., 2005]; en su DPS se encuentran todas las proteínas antes descritas, sin embargo existe una marcada diferencia con respecto a la cantidad de iGluR's, éste tipo de espina posee receptores de tipo NMDA expresados en su membrana pero tiene una pobre cantidad de receptores tipo AMPA [Matsuzaki y cols., 2001; Ganeshina y cols., 2004; Ashby y cols., 2006], lo que permite que posteriormente estas espinas se puedan reforzar por medio de la adición de AMPAR's. Esta característica es la que podría explicar la elevada capacidad que tienen estas espinas de regularse en cuanto a su forma, tamaño y función, ya que las espinas delgadas mantienen una flexibilidad que les permite ampliarse y estabilizarse o reducirse y quitarse, así como crear nuevas entradas sinápticas débiles; es decir, la propiedad que tienen las espinas delgadas de poder ser reforzadas a través de la incorporación de más AMPAR's podría ser la razón de la elevada plasticidad sináptica característica de las espinas delgadas, convirtiendo a estas espinas en las mejores candidatas para ser las *espinas de aprendizaje* [Ehlers, 2003; Kasai y cols., 2003; Alvarez y Sabatini, 2007]. En nuestros resultados podemos observar un incremento en general de este tipo de espina dendrítica en los grupos tratados respecto a sus controles (**Figura 21, 22 y 23**), sin embargo esto no quiere decir que estos animales tengan una mayor capacidad plástica y puedan aprender mejor ya que dichos animales fueron evaluados en una etapa adulta, es decir, en una etapa donde muchas de esas espinas delgadas debieron haber madurado para dar lugar a una espina más estable y con una capacidad de retención de información mayor que la que poseen en su etapa inmadura.

Posteriormente una espina delgada inmadura se convierte en una espina de tipo hongo madura por medio de un proceso de PLP. Este proceso comienza con una repetida liberación presináptica de glutamato, la liberación de glutamato a su vez permite la activación de los AMPAR's y la despolarización de la neurona postsináptica, esta

despolarización permite que los NMDAR's se liberen del Mg^{2+} y la consecuente entrada de Ca^{2+} a través de estos canales y de los canales de calcio dependientes de voltaje; el flujo de Ca^{2+} activa cinasas, las cuales a su vez modulan sustratos que contribuyen a los cambios estructurales por medio de la regulación del citoesqueleto o inducen la transcripción y síntesis de nuevas proteínas, las cuales se trasladan a la membrana de la espina dendrítica [Lamprecht y LeDoux, 2004], logrando así que el tamaño de la cabeza crezca gracias a las modificaciones que se realizan en el citoesqueleto y al incremento de tamaño de la DPS. Las espinas de tipo hongo maduras poseen una DPS mucho mayor que las espinas delgadas [Harris y cols., 1992] y, a diferencia de éstas, las espinas de hongo tienen una mayor expresión de AMPAR's en su membrana con respecto a la expresión de los NMDAR's, lo cual permite que las sinapsis que engloban a este tipo de espinas sean funcionalmente más fuertes o estables [Ganeshina y cols., 2004; Ashby y cols., 2006]. Todos estos hechos sugieren que las espinas de tipo hongo son mucho más estables que otras espinas y por ello son consideradas *espinas de memoria* [Kasai y cols., 2003]. La administración de los antagonistas a los iGluR's disminuyó drásticamente las espinas dendríticas de tipo hongo o maduras, si se compara con los respectivos grupos controles (**Figura 21, 22 y 23**), lo que podría significar que estos antagonistas impidieron la correcta maduración de las espinas al no permitir que los iGluR's tuvieran un funcionamiento normal; dejando a la vez más espinas inmaduras que no pueden seguir su proceso de maduración, lo que se relaciona a su vez con la mayor cantidad de espinas delgadas observadas en los grupos tratados y esto podría traducirse como una alteración en el aprendizaje y la memoria.

Una segunda espina dendrítica madura, que se forma en condiciones normales en el hipocampo, es la denominada espina bifurcada. Se piensa que este tipo de espina es una espina de tipo hongo que ha sufrido un proceso de modificación conocido como "perforación", en dicho proceso la espina de hongo empieza a revelar una hendidura en su membrana sináptica, y esta hendidura comienza una separación de la DPS de la espina de hongo y, en conjunto con la activación de las proteínas que se encargan de la modificación estructural del citoesqueleto (como lo es la actina), se comienza a crear un segundo botón sináptico pero que queda junto al botón que le dio origen, dando lugar a una espina dendrítica con doble botón, es decir, una espina dendrítica bifurcada [Lamprecht y LeDoux, 2004]. Se puede observar en nuestros resultados que los antagonistas a los iGluR's no sólo disminuyeron las espinas dendríticas de tipo hongo, sino que de la misma forma ocurrió una disminución de las espinas bifurcadas (**Figura 21, 22 y 23**), lo que es coherente con la teoría de la formación de este tipo de espinas ya que al impedir la maduración de las espinas delgadas éstas no se pueden transformar en espinas de hongo y al haber una menor cantidad de espinas de tipo hongo por consiguiente se esperaría una menor expresión de las espinas bifurcadas, puesto que éstas son originadas por las dendritas de tipo hongo. Se piensa que la razón por la cual las espinas maduras tipo hongo sufran el proceso de perforación para dar lugar a una espina bifurcada, en el hipocampo, es para generar un incremento de superficie de contacto y por tanto un aumento en el número de los posibles contactos sinápticos [Kasai y cols., 2003; Lamprecht y LeDoux, 2004]. Por lo tanto una

disminución de estas espinas nos daría más evidencia de que las alteraciones que se observaron en el aprendizaje y la memoria fueron originados por las propias alteraciones que las neuronas del hipocampo, sus espinas dendríticas y sus conexiones sinápticas sufrieron a causa de la administración de los antagonistas a los iGluR's.

Finalmente se encuentran las espinas de tipo gruesas, se piensa que este tipo son espinas que han sufrido un proceso de “retroceso” convirtiendo a estas espinas en alguna clase de espinas “viejas”, las cuales ya no tienen la capacidad de ser plásticas, puesto que han perdido gran parte de su DPS y con ella su función [Lamprecht y LeDoux, 2004]. La administración crónica de los antagonistas ocupados produjo diversos resultados en los grupos tratados. En el grupo D-AP5 indujo una disminución de este tipo de espinas (**Figura 21**), lo que podría ser consistente con todo lo antes mencionado ya que al haber menos espinas inmaduras se presenta una menor cantidad de espinas gruesas; mientras que en el grupo administrado con GYKI no se observaron cambios significativos del grupo tratado con respecto a su control (**Figura 22**); sin embargo este no es el caso del grupo UBP en donde se puede apreciar una producción mayor de las espinas de tipo gruesas comparado con su grupo control (**Figura 23**), esto podría deberse a la localización y a la función como tal de los KAR's (que es el receptor en específico al que antagoniza el UBP-302), puesto que se piensa que este receptor se encuentra en la membrana presináptica permitiendo la regulación de la liberación del glutamato [Kamiya y Ozawa, 1998; Rodriguez-Moreno y Sihra, 2004], ya sea a la alta o a la baja dependiendo de la concentración en el espacio intersináptico del propio glutamato [Contractor y cols., 2001; Lauri y cols., 2001; Schmitz y cols., 2001], y por tanto este receptor influye en la maduración de las espinas (como ya se observó anteriormente) pero al parecer la alteración de este receptor, y de su consiguiente modificación en la regulación de la liberación de glutamato, resulta en una producción mayor de espinas de tipo gruesas, lo que podría darnos a entender que posiblemente sí se producen espinas maduras en estos animales tratados con UBP pero, de alguna manera, la modificación de este receptor no permite que se estabilicen de manera normal, logrando al final que esas espinas maduras se conviertan en espinas “viejas” y con pérdida de su función.

En resumen la administración crónica del antagonista específico de los NMDAR's, el D-AP5, indujo una alteración en la morfología de las espinas dendríticas resultando en una disminución de las espinas maduras (tipo hongo y bifurcada) y en un incremento de las espinas inmaduras (delgadas) (**Figura 21**). Lo mismo ocurrió para el grupo administrado con el antagonista específico de los AMPAR's, el GYKI-53655 (**Figura 22**), y para el grupo administrado con el antagonista específico de los KAR's, el UBP-302 (**Figura 23**). Interesantemente el D-AP5 también redujo las espinas tipo gruesas, mientras que el GYKI-53655 no tuvo efecto sobre este tipo de espinas y el UBP-302 incluso causo el efecto contrario del antagonista de los receptores a NMDA, un incremento de las espinas tipo gruesas. Estas últimas diferencias podrían estar participando en el efecto que tuvo el DAP-5 sobre la memoria a largo plazo, el cual tuvo un mayor efecto sobre la memoria a largo plazo comparado con los otros dos antagonistas.

Esta alteración en los tipos de espinas dendríticas que se obtuvo después de una administración crónica de estos antagonistas demuestra que los iGluR's poseen un papel fundamental en el correcto desarrollo y maduración de las espinas dendríticas, puesto que se puede apreciar que al antagonizar a estos receptores se producen alteraciones no sólo a nivel de la densidad de espinas dendríticas de CA1, lo cual ya es un indicativo de una posible disminución en las sinapsis del hipocampo [Moser y cols., 1994; Fiala, 2008], sino que además se producen modificaciones en la morfología de las espinas dendríticas, teniendo como resultado una disminución de las espinas que poseen una mayor superficie de contacto para las sinapsis (las espinas de hongo y las bifurcadas) [Ehlers, 2003; Yao y cols., 2008], y un incremento de las espinas inmaduras; lo que nos sugiere que los iGluR's podrían estar regulando mecanismos que participan en la maduración de las espinas dendríticas [Buchs y Muller, 1996; Harris y cols., 2003; Lerma, 2003].

Así mismo estos resultados se pueden correlacionar con la estructura-función de las sinapsis en las neuronas, la cual establece que las espinas más grandes producen grandes corrientes sinápticas y que estas espinas dendríticas más grandes son más estables en comparación con las espinas delgadas o pequeñas que son transitorias [Carlisle y Kennedy, 2005; Bhatt y cols., 2009; Holtmaat y Svoboda, 2009; Yoshihara y cols., 2009; Segal, 2010]; es decir que las espinas más grandes o maduras (que son las que tienen una mayor DPS) son las más estables y persistentes, y por tanto podrían ser las que permiten la memoria a largo plazo a través de los procesos de plasticidad tales como la PLP y la DLP [Harris y cols., 1992; Nusser y cols., 1998]. De la misma manera se ha observado que el aprendizaje envuelve procesos donde las espinas delgadas inmaduras sufren modificaciones que conllevan a un incremento de la DPS, lo que se traduce en un incremento de tamaño y en una mayor estabilidad de la espina [Harris y cols., 2003; Bourne y Harris, 2007; Holtmaat y Svoboda, 2009].

9.1.3 Expresión de GFAP, actina y sinaptofisina en CA1, CA3 y DG

La correcta comunicación en la formación hipocampal es de suma importancia para que se lleven a cabo las funciones del aprendizaje y la memoria asociadas a éste núcleo cerebral, tal como lo es la memoria de tipo asociativa (que es el tipo de memoria que se evaluó en este proyecto). La información entra por la corteza entorrinal (EC) y de ahí llega al DG, las neuronas del DG comunican con CA3 a través de las fibras musgosas (MF) y CA3 comunica con CA1 a través de las colaterales de Schaffer (SC), CA1 manda su información al Sub, y para completar el circuito el Sub manda la información hacia la salida de la EC [Amaral y Lavenex, 2007; Andersen y cols., 2007]. En esta descripción de la intercomunicación que sucede en la formación hipocampal podemos apreciar la importancia que tiene no solamente CA1, sino a sí mismo la relevancia que posee el área CA3 y el DG, ya que es el DG el que manda la información de entrada (que le llega desde la EC) hasta CA3, el cual a su vez manda dicha información hasta CA1 y es de esta manera como el hipocampo puede recolectar la información que le llega desde el medio externo, es decir, es a través de una correcta comunicación entre el DG, CA3 y CA1 como el hipocampo puede realizar, para términos del presente proyecto, una asociación de los objetos que se presentan en el medio externo del animal, para que pueda distinguir el objeto que ya conoce y discriminarlo del que no. Por todas estas razones es que se eligió realizar el análisis de las proteínas GFAP, *actina* y *sinaptofisina* no sólo en el área CA1, sino también en las áreas CA3 y en el DG, puesto que son 3 proteínas que nos pueden dar una apreciación indirecta de cómo se encuentra la comunicación que se está llevando a cabo en las neuronas de dichas áreas.

La proteína GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) es un filamento intermedio de la maduración de los astrocitos en el SNC de los mamíferos y se expresa mayormente en los astrocitos activos, por ello es denominado como un marcador de la diferenciación astrocítica durante el desarrollo y un marcador de la gliosis reactiva seguida de algún daño en el SNC [Dahl, 1981; Bovolenta y cols., 1984; Mathewson y Berry, 1985]. Durante la maduración de los astrocitos se llevan a cabo diversos cambios fenotípicos y la activación de estas células se produce un incremento enorme en la síntesis de proteínas de filamentos intermedios, especialmente el GFAP, ya que éste es indispensable para la formación de gliofilamentos en la respuesta morfológica astrogliosa posterior a un daño [Condorelli y cols., 1990; Eng y Ghirnikar, 1994]. Podemos observar en nuestros resultados que en los animales administrados con los antagonistas a los NMDAR's, a los AMPAR's y a los KAR's no se aprecia inmunorreactividad al GFAP en el hipocampo dorsal CA1 (**Figuras 24-1 y 25**), así como tampoco se aprecian cambios en CA3 (**Figuras 28-1 y 29**), ni en el DG (**Figuras 32-1 y 33**), es decir, la administración crónica de los antagonistas a los iGluR's no indujo la activación de los astrocitos. Por lo cual podríamos agregar que las alteraciones presentes en el aprendizaje y la memoria no están ligadas en este caso a una activación exacerbada de las células gliales.

Por otra parte la formación de las espinas dendríticas durante el desarrollo y la plasticidad sináptica que poseen dichas espinas son aspectos críticos de la sinaptogénesis y

de la plasticidad sináptica, donde diversos factores y proteínas intervienen para que se lleve a cabo un correcto desarrollo y una adecuada remodelación estructural de las espinas dendríticas; entre estas proteínas se encuentran la *actina* y la *sinaptofisina* [Fischer y cols., 2000; Matus y cols., 2000].

La *actina* es una proteína del citoesqueleto que al activarse puede modificar la estructura de éste; es una proteína esencial del citoesqueleto que tiene una función vital en los procesos de guía del axón, en el desarrollo sináptico y en la plasticidad sináptica [Dillon y Goda, 2005]. Los filamentos de *actina* son la base por la cual se llevan a cabo tanto la formación de las espinas dendríticas durante el desarrollo como la maduración de estas para dar lugar a sinapsis maduras [Fischer y cols., 2000; Matus y cols., 2000]. A sí mismo se ha sugerido que la actina tiene una función crítica en la actividad dependiente de la plasticidad sináptica [Colicos y cols., 2001; Okamoto y cols., 2004], puesto que se ha demostrado que diversas moléculas pueden influenciar las propiedades de las espinas en respuesta a señales externas mediante moléculas de adhesión celular, Rho GTPAsas o alterando flujos de Ca^{2+} , que al final pueden modificar la dinámica de la actina [Ethell y Pasquale, 2005].

Se puede apreciar que los antagonistas a los iGluR's produjeron una disminución de la expresión de la *actina* en todos los grupos tratados con respecto a sus controles en CA1 (**Figuras 24-2 y 26**); no así para el caso de CA3 donde sólo se aprecian diferencias significativas del grupo D-AP5 (**Figuras 28-2 y 30**); mientras que en el DG sólo se muestran diferencias entre el grupo UBP con respecto a su control (**Figuras 32-2 y 34**); sin embargo se puede apreciar una clara tendencia de todos los grupos tratados con los antagonistas, a disminuir la expresión de la *actina*. Esto podría traducirse en una disminución de la capacidad de las espinas dendríticas para poder modificar la estructura de su citoesqueleto, impidiendo así que las espinas dendríticas puedan madurar, puesto que aunque se lleve a cabo el inicio del proceso de PLP (lo que muy probablemente se está impidiendo con la administración de los antagonistas a los iGluR's), al expresar menos actina las espinas dendríticas no podrían modificar su citoarquitectura para poder incrementar la DPS y de esta manera poder estabilizarse y madurar [Lamprecht y LeDoux, 2004; Bourne y Harris, 2007].

La *sinaptofisina* más que estar involucrada en la remodelación del citoesqueleto, se encuentra implicada en lo que se denomina como eficiencia sináptica, la cual también tiene que ver con otras proteínas conocidas como SNARE. Estas proteínas forman un complejo (Sinaptofisina-Sinaptobrevina-VAMP2) que da como resultado el acoplamiento y unión de la membrana vesicular con la membrana presináptica, para dar lugar finalmente a la liberación del neurotransmisor [Edelman y cols., 1995; Washbourne y cols., 1995]. La propiedad de la *sinaptofisina* para asociarse con el complejo Sinaptobrevina-VAMP2, puede ser un regulador durante el desarrollo que ocurre después de los contactos sinápticos [Becher y cols., 1999]. Los resultados en nuestro estudio revelan que los animales administrados con los antagonistas a los iGluR's tienen una disminución marcada en la expresión de sinaptofisina en todos los grupos tratados comparados con sus respectivos grupos control en las 3 áreas, CA1, CA3 y DG, lo cual se traduciría en una disminución de

la capacidad de las espinas dendríticas de formar el complejo Sinaptofisina-Sinaptobrevina-VAMP2, por lo que esto afectaría la eficiencia sináptica y por ende se produciría una alteración de la correcta comunicación sináptica entre las áreas del DG-CA3-CA1. Lo observado en nuestros resultados van de la mano con los de Bacci y cols., 2001, donde ellos demuestran que un bloqueo crónico con antagonistas de receptores a glutamato disminuyen la formación del complejo Sinaptofisina-Sinaptobrevina-VAMP2.

Además todos estos resultados se pueden correlacionar con los obtenidos por Reagh y cols., 2014, donde se observa que no sólo el área CA1 se encuentra implicada en la formación de la memoria de reconocimiento, sino que también participan tanto el DG como el área CA3, y puesto que estas áreas se encuentran afectadas en la expresión de *actina* y de *sinaptofisina*, podrían estar participando en la disminución del aprendizaje y la memoria observados en las pruebas conductuales de los animales tratados con los antagonistas, ya que existe una alteración en la intercomunicación de la formación hipocampal y por ende los animales experimentales no son capaces de aprender o de almacenar la información de los objetos.

Por lo tanto los resultados obtenidos en la densidad y tipificación de las espinas dendríticas, en conjunto con los resultados obtenidos con las técnicas de inmunofluorescencia de nuestros grupos, podrían explicar a su vez las alteraciones en el comportamiento de los animales que se observaron durante la prueba NOR, puesto que una disminución en la densidad de las espinas dendríticas en conjunto con una marcada disminución de las espinas maduras (hongo y bifurcada) y un incremento en las espinas inmaduras (delgadas), así como una disminución en la expresión de la *actina* y de la *sinaptofisina*, en CA1, CA3 y el DG, podría explicar la alteración en el aprendizaje y la disminución de la memoria a corto y largo plazo que presentaron los animales de los grupos administrados con los antagonistas.

10. Conclusiones

Se puede concluir que:

- ❖ La administración crónica de antagonistas específicos para los iGluRs durante las dos primeras semanas de vida de las ratas (pico máximo de expresión de estos receptores en el hipocampo [Ritter y cols., 2002]) altera los procesos de adquisición y procesamiento de la información, ya que disminuye tanto el *tiempo de reconocimiento* como el *índice de discriminación* de los objetos novedosos, 2 y 24 horas después del aprendizaje. Es decir se encuentra alterado el aprendizaje, la memoria de corto plazo de tipo asociativa y la memoria a largo plazo.
- ❖ Así mismo la administración crónica de los antagonistas a los iGluR's produjo una disminución de la densidad de las espinas dendríticas, así como una disminución de las espinas maduras y un incremento en las espinas inmaduras, lo que nos lleva a proponer que los iGluR's poseen un papel fundamental en el correcto desarrollo y maduración de las espinas dendríticas, puesto que al antagonizarlos se está impidiendo la maduración de las espinas, dando como resultado una disminución de estas y un incremento de las espinas inmaduras, lo que a su vez puede explicar la alteración en la conducta del aprendizaje y la memoria.
- ❖ De la misma manera en los animales tratados con los antagonistas se presentó una disminución en la expresión de *actina* y de *sinaptofisina*, tanto en CA1 como en CA3 y en el DG, sin cambios en la expresión de GFAP. Lo que se relaciona con todos los resultados obtenidos anteriormente y los cuales explican la disminución del aprendizaje y de la memoria que presentaron los grupos experimentales con respecto a sus controles.

11. Bibliografía

- Alquicer G., Morales-Medina J. C., Quirion R. y Flores G. 2008. Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 35, pág. 179-187.
- Alvarez V. A. y Sabatini B. L. 2007. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*. Vol. 30, pág. 79-97.
- Amaral D. y Lavenex P. 2007. *Hippocampus Book*. Capítulo 3, *Hippocampal Neuroanatomy*. Oxford University Press, pág. 37-38, 52-56, 66-69.
- Andersen P., Morris R., Amaral D., Bliss T. y O'keefe J. 2007. *Hippocampus Book*. Capítulo 1, *The Hippocampal Formation*. Capítulo 2, *Historical Perspective: Proposed Functions, Biological Characteristics, and Neurobiological Models of the Hippocampus*. Oxford University Press, pág. 3-31.
- Anwyl R. 1999. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews*. Vol. 29, pág. 83-120.
- Antunes M. y Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process*. Springer. Vol. 13, pág. 93-110.
- Ashby M. C., Maler S. R., Nishimune A. y Henley J. M. 2006. Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 26, pág. 7046-7055.
- Bacci A., Coco S., Pravettoni E., Schenk U., Armano S., Frassoni C., Verderio C., De Camilli P. y Matteoli M. 2001. Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between Synaptophysin-Synaptobrevin-Vesicle associated membrane protein 2. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 21, pág. 6588-6596.
- Bahn S., Volk B. y Wisden W. 1994. Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *Journal of Neuroscience*. Vol. 14, pág. 5525-5547.
- Baxter M. G. 2010. "I've seen it all before": Explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). *Behavioral Neuroscience*. Vol. 124, pág. 706-709.
- Bear M. F. y Malenka R. C. 1994. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*. Vol. 4, pág. 389-399.
- Becher A., Drenckhahn A., Pahner I., Margittai M., Jahn R. y Ahnert-Hilger G. 1999. The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation. *Journal of Neuroscience*. Vol. 19, pág. 1922-1931.

- Benice T. S., Rizk A., Kohama S., Pfankuch T., Raber J. 2006. Sex differences in age-related cognitive decline in C57BL/6 J mice associated with increased brain microtubule associated protein 2 and synaptophysin immunoreactivity. *Neuroscience*. Vol. 137, pág. 223–423.
- Bhatt D. H., Zhang S. y Gan W. B. 2009. Dendritic spine dynamics. *Ann Rev. Physiol.* Vol. 71, pág. 261–282.
- Bliss T. V. P. y Lomo T. 1973. Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*. Vol. 232, pág. 331-356.
- Bliss T. V. P. y Collingridge G. L. 1993. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. Vol. 361, pág. 31-39.
- Bourne J. y Harris K. M. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* Vol. 17, pág. 381–386.
- Bourne, J. N. y Harris K. M. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience*. Vol. 31, pág. 47–67.
- Bovolenta P., Liem R. K. H. y Mason C. 1984. Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev Biol.* Vol. 102, pág. 248-259.
- Buchs P. A. y Muller D. 1996. Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 15, pág. 8040–8045.
- Buckmaster C. A., Eichenbaum H., Amaral D. G., Suzuki W. A. y Rapp P. R. 2004. Entorhinal Cortex Lesions Disrupt the Relational Organization of Memory in Monkeys. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 44, pág. 9811-9825.
- Burke S. N., Wallace J. L., Nematollahi S., Uprety A. R. y Barnes C. A. 2010. Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behavior Neuroscience*. Vol. 124, pág. 559–573.
- Butz M., Wörgötter F. y van Ooyen A. 2009. Activity-dependent structural plasticity. *Brain Research Reviews*. Vol. 60, pág. 287-305.
- Carlini V. P. 2011. The Object Recognition Task: A New Proposal for the Memory Performance Study. *Object Recognition*, Capítulo 3. Editado por Tam Phuong Cao, pág. 27-42.
- Carlisle H. J. y Kennedy M. B. 2005. Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* Vol. 28, pág. 182–187.
- Citri A. y Malenka R. C. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. Vol. 33, pág. 18-41.
- Clark R. E., Zola S. M. y Squire L. R. 2000. Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 23, pág. 8853-8860.
- Colicos M. A., Collins B. E., Sailor M. J. y Goda Y. 2001. Remodeling of synaptic actin induced by

- photoconductive stimulation. *Cell*. Vol. 107, pág. 605– 616.
- Collingridge G. L., Isaac J. T. y Wang Y. T. 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 5, pág. 952-962.
- Condorelli D. F., Dell'Albani P., Kaczmarek L., Messina L., Spampinato G., Avola R., Messina A. y Giuffrida Stella A. M. 1990. Glial fibrillary acidic protein messenger RNA and glutamine synthetase activity after nervous system injury. *Journal of Neuroscience*. Vol. 26, pág. 251–257.
- Conn P. J. y Pin J. P. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol. 37, pág. 205-237.
- Contractor A., Swanson G. y Heinemann S. F. 2001. Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*. Vol. 29, pág. 209-216.
- Conway A. R. A., Kane M. J. y Engle R. W. 2003. Working memory capacity and its relation to general intelligence. *TRENDS in Cognitive Sciences*. Vol. 7, pág. 547-552.
- Cull-Candy S. G. y Leszkiewicz D. N. 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science of Signal Transduction Knowledge Environment*. Vol. 255, pág. 16.
- Curtis C. E. y D'Esposito M. 2003. Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *TRENDS in Cognitive Sciences*. Vol. 7, pág. 415-423.
- Dahl D. 1981. The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *Journal of Neuroscience*. Vol. 6, pág. 741-748.
- Dente L, Ruther
- Dere E., Huston J. P. y De Souza Silva M. A. 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem*. Vol. 84, pág. 214–221.
- Derkach V. A., Oh M. C., Guire E. S. y Soderling T. R. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 8, pág. 101-113.
- Dillon C. y Goda Y. 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annual Review of Neuroscience*. Vol. 28, pág. 25–55.
- Dudek S. M. y Bear M. F. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. Vol. 89, pág. 4363-4367.
- Eacott M. J. y Norman G. 2004. Integrated memory for object, place, and context in rats: A possible model of episodic-like memory? *The Journal of Neuroscience*. Vol. 24, pág. 1948-1953.
- Edelman L., Hanson P. I., Chapman E. R. y Jahn R. 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling exocytotic fusion machine. *EMBO J*. Vol. 14, pág. 224–231.
- Ehlers M. D. 2003. Activity level controls

- postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. Nature Publishing Group, Nature Neuroscience. Vol. 6, pág. 231-242.
- Eng L. F. y Ghirnikar R. S. 1994. GFAP and astrogliosis. Brain Pathology. Vol. 4, pág. 229 –237.
- Ennaceur A. y Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behavioural Brain Research. Vol. 31, pág. 47-59.
- Ennaceur A. 2010. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. Behavioural Brain Research. Vol. 215, pág. 244-254.
- Enns J. T. 2004. The thinking eye, the seeing brain: explorations in visual cognition. New York: W. W. Norton & Company.
- Ergorul C. y Eichenbaum H. 2004. The hippocampus and memory for “What,” “Where,” and “When”. Learning and Memory. Vol. 11, pág. 397-405.
- Ethell I. M. y Pasquale E. B. 2005. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. Prog Neurobiol. Vol. 75, pág. 161–205.
- Feldman R. S., Meyer J. S. y Quenzer L. F. 1997. Principles of neuropsychopharmacology, capítulo VIII, editorial Sinauer. USA.
- Feldman R. S. 2005. Psicología: con aplicaciones en países de habla hispana. 6ta edición México, McGrawHill.
- Fiala J. C., Feinberg M., Popov V. y Harris K. M. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. Journal of Neuroscience. Vol. 18, pág. 8900-8911.
- Fiala J. C., Allward B. y Harris K. M. 2002 a. Dendritic spines do not Split during hippocampal LTP or maturation. Nature Neuroscience. Vol. 5, pág. 297-298.
- Fiala J. C., Spacek J. y Harris K. M. 2002 b. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? Brain Research Reviews. Vol. 39, pág. 29-54.
- Fiala J. C., Spacek J. y Harris K. M. 2008. Dendritic structure, Chapter 1, en Dendrites, second edition; Greg Stuart Oxford University Press. Pág. 1-41.
- Fischer M., Kaech S., Wagner U., Brinkhaus H. y Matus A. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. Nature Neuroscience. Vol. 3, pág. 887–894.
- Fuster J. M. y Alexander G. E. 1971. Neuron activity related to short-term memory. Science. Vol. 173, pág. 652-654.
- Ganeshina O., Berry R. W., Petralia R. S., Nicholson D. A. y Geinisman Y. 2004. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. The Journal of Comparative Neurology. Vol. 468, pág. 86-95.
- García S. y Pazos A. 2003. Receptores para neurotransmisores. Ediciones en Neurociencias, Barcelona, pág. 241-244.
- Goudet C., Magnaghi V., Landry M.,

- Nagy F., Gereau R. y Pin J. P. 2008. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain Research Reviews*. Vol. 60, pág. 43-56.
- Gray J. R. y Thompson P. M. 2004. Neurobiology of intelligence: science and ethics. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 5, pág. 471-482.
- Hale G. y Good M. 2005. Impaired visuospatial recognition memory but normal object novelty detection and relative familiarity judgments in adult mice expressing the APP^{swe} Alzheimer's disease mutation. *Behavior Neuroscience*. Vol. 119, pág. 884-891.
- Hammond R. S., Tull L. E. y Stackman R. W. 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. Vol. 82, pág. 26-34.
- Harris K. M. 1999. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*. Vol. 9, pág. 343-348.1
- Harris K. M., Fiala J. C. y Ostroff L. 2003. Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *The Royal Society*. Vol. 358, pág. 745-748.
- Harris K. M., Jensen F. E. y Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 12, pág. 2685-2705.
- Hollmann M., Hartley M. y Heinemann S. 1991. Ca²⁺ permeability of KA AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*. Vol. 252, pág. 851-853.
- Holtmaat A. y Svoboda K. 2009. Experience dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci*. Vol. 10, pág. 647-658.
- Hsia A. Y., Malenka R. C. y Nicoll R. A. 1998. Development of excitatory Circuitry in the hippocampus. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 79, pág. 2013-2024.
- Humphreys G., Price C. y Riddoch J. 1999. From objects to names: A Cognitive neuroscience approach. *Psychological Research*. Vol. 62, pág. 118-130.
- Jiménez-Díaz L., Navarro-López J., Gruart A. y Delgado-García J. M. 2004. Role of Cerebellar Interpositus Nucleus in the Genesis and Control of Reflex and Conditioned Eyelid Responses. *The Journal of Neuroscience*. Vol. 24, pág. 9138-9145.
- Johansen J. P., Cain C. K., Ostroff L. E. y LeDoux J. E. 2011. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *National Institute of Health Public Access*. Vol. 147, pág. 509-524.
- Kamiya H. y Ozawa S. 1998. Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *Journal of Physiology*. Vol. 509, pág. 833-845.
- Kandel E. R., Jessell T. M. y Schwartz J. H. 2000. *Principles of Neuroscience*.

- McGraw-Hill, New York, 4ta edición. USA.
- Kasai H., Matsuzaki M., Noguchi J., Yasumatsu N. y Nakahara H. 2003. Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *TRENDS in Neurosciences*. Vol. 26, pág. 360-368.
- Khodorova A., Richter J., Vasko M. R. y Strichartz G. 2009. Early and late contributions of glutamate and CGRP to mechanical sensitization by endothelin-1. National Institute of Health Public Access, *Journal of Pain*. Vol. 10, pág. 740-749.
- Kida S., Josselyn S. A., de Ortiz S. P., Kogan J. H., Chevere I., Masushige S. y Silva A. J. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nature Neuroscience*. Vol. 5, pág. 348-355.
- Kreitzer A. C. y Malenka R. C. 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*. Vol. 60, pág. 543-554.
- Kumar Nayak P. 2012. Pharmacological preconditioning with GYKI-52466: a prophylactic approach to neuroprotection against ischaemic stroke in the rat. The University of Otago, Dunedin, New Zealand.
- Lamprecht R. y LeDoux J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 5, pág. 45-54.
- Lauri S. E., Bortolotto Z. A., Bleakman D., Ornstein P. L., Lodge D., Isaac J. T. y Collingridge G. L. 2001. A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron*. Vol. 32, pág. 697-709.
- Lerma J. 1991. Spermine regulates N-methyl-D-aspartate receptor desensitization. *Neuron*. Vol. 8, pág. 343-352.
- Lerma J. 2003. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 4, pág. 481-495.
- Lerma J. 2006. Kainate receptor physiology. *Current Opinion in Pharmacology*. Vol. 6, pág. 89-97.
- Lerma J., Zukin R. S. y Bennett M. V. 1991. Interaction of Mg⁺² and phencyclidine in use-dependent block of NMDA channels. *Neuroscience Letters*. Vol. 123, pág. 187-191.
- Lynch M. A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*. Vol. 84, pág. 87-136.
- MacDonald J. F., Bartlett M. C., Mody I., Pahapill P., Reynolds J. N., Salter M. W., Schneiderman J. H. y Pennefather P. S. 1991. Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptors currents in cultured mouse hippocampal neurones. *Journal of Physiology*. Vol. 432, pág. 483-508.
- Madden D. R. 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 3, pág. 91-101.
- Maguire E. A., Burgess N., Donnett J. G., Frackowiak R. S. J., Frith C. D. y O'Keefe J. 1998. Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science*. Vol. 280, pág. 921-924.
- Malenka R. C. y Bear M. F. 2004. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron*. Vol. 44, pág. 5-21.

- Maren S., Ferrario C. R., Corcoran K. A., Desmond T. J. y Frey K. A. 2003. Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. *Protein synthesis in the amígdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. European Journal of Neuroscience.* Vol. 18, pág. 3080-3088.
- Mathewson A. J. y Berry M. 1985. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Research.* Vol. 327, pág. 61-69.
- Matsuzaki M., Ellis-Davies G. C., Nemoto T., Miyashita Y., Iino M. y Kasai H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience.* Vol. 4, pág. 1086-1092.
- Matus A., Brinkhaus H., Wagner U. 2000. Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus.* Vol. 10, pág. 555-560.
- Morgado I. 2005. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología.* Vol. 40, pág. 289-297.
- Moser M. B., Trommald M. y Andersen P. 1994. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 91, pág. 12673-12675.
- Neves G., Cooke S. F. y Bliss T. V. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience.* Vol. 9, pág. 65-75.
- Nicoll R. A. y Malenka R. C. 1995. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* Vol. 377, pág. 115-118.
- Nicoll R. A. y Schmitz D. 2005. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews Neuroscience.* Vol. 6, pág. 863-876.
- Nusser Z., Lujan R., Laube G., Roberts J.D., Molnar E. y Somogyi P. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron.* Vol. 3, pág. 545-559.
- Okamoto K., Nagai T., Miyawaki A. y Hayashi Y. 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature Neuroscience.* Vol. 7, pág. 1104-1112.
- Pin P. J. y Duvoisin R. 1995. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology.* Vol. 34, pág. 1-26.
- Portera-Cailliau C. y Yuste R. 2001. Sobre la función de los filopodios dendríticos. *Revisiones en Neurociencia, Revista de Neurología.* Vol. 33, pág. 1158-1166.
- Reagh Z. M., Watabe J., Ly M., Murray E. y Yassa M. A. 2014. Dissociated Signals in Human Dentate Gyrus and CA3 Predict Different Facets of Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience.* Vol. 34, pág. 13301-13313.
- Relloso G. 2007. *Psicología.*

- Departamento de Producción de Colegial Bolivariana, C.A. pág. 121
- Riddoch M. y Humphreys G. 2001. Object Recognition. In B. Rapp (Ed.), *Handbook of Cognitive Neuropsychology*. Hove: Psychology Press.
- Ritter L. M., Vazquez D. M. y Meador-Woodruff. 2002. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Developmental Brain Research*. Vol. 139, pág. 227-236.
- Rodriguez-Moreno A. y Sihra T. S. 2004. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *Journal of Physiology*. Vol. 557, pág. 733-745.
- Schmitz D., Mellor J. y Nicoll R. A. 2001. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*. Vol. 291, pág. 1972-1976.
- Sejnowski T. J. 1999. The book of Hebb. *Neuron*. Vol. 24, pág. 773-776.
- Silva-Gómez A. B, Rojas D., Juárez I. y Flores G. 2003. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Research*. Vol. 983, pág. 128-136.
- Traynelis S. F., Wollmuth L. P., McBain C. J., Menniti F. S., Vance K. M., Ogden K. K., Hansen K. B., Yuan H., Myers S. J. y Dingledine R. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacology Review*. Vol. 62, pág. 405-496.
- Tulving E. 1983. Elements of episodic memory. *Oxford Psychology Series*. Clarendon. No. 2, pág. 385.
- Tyzio R., Represa A., Jorquera I., Ben-Ari Y., Gozlan H. y Aniksztejn L. 1999. The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *Journal of Neuroscience*. Vol. 19, pág. 10372-10382.
- Vesikansa A. 2013. Developing glutamatergic connectivity in the hippocampus: the role of tonically active kainate receptors. Faculty Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki.
- Ward J. 2006. *The student's guide to cognitive neuroscience*. New York: Psychology Press.
- Washbourne P., Schiavo G., Montecucco C. 1995. Vesicle-associated membrane protein-2 (synaptobrevin-2) forms a complex with synaptophysin. *Biochem J*. Vol. 305, pág. 721-724.
- Watkins J. C. y Evans R. H. 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol. 21, pág. 165-204.
- Williams M. T., Herring N. R., Schaefer T. L., Skelton M. R., Campbell N. G., Lipton J. W., McCrea A. E. y Vorhees C. V. 2007. Alterations in body temperature, corticosterone, and behavior following the administration of 5-methoxy diisopropyltryptamine ('foxy') to adult rats: a new drug of abuse. *Neuropsychopharmacology* 32:1404-1420.
- Yao W. D., Spealman R. D. y Zhang J. 2008. Dopaminergic signaling in

- dendritic spines. National Institutes of Health Public Access, *Biochemical Pharmacology*. Vol. 75, pág. 2055-2069.
- Yashiro K. y Philpot B. D. 2008. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*. Vol. 55, pág. 1081-1094.
- Yuste R. y Bonhoeffer T. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*. Vol. 5, pág. 23–34.
- Yoshihara Y., De Roo M. y Muller D. 2009. Dendritic spine formation and stabilization. *Curr. Opin. Neurobiol.* Vol. 19, pág. 146–153.
- Zuo Y., Yang G., Kwon E. y Gan W-B. 2005. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature*. Vol. 436, pág. 261-265.