

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Participación de los endocannabinoides estriatales en la
consolidación de la memoria de reconocimiento de objeto**

Tesis presentada para obtener el título de licenciatura en:

BIOLOGÍA

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL ZAMORA URSULO

DIRECTORA:

DRA. GINA LORENA QUIRARTE

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM



Noviembre, 2015

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a mi tutora, la Dra. Gina Lorena Quirarte y al Dr. Roberto A. Prado Alcalá, por haber confiado, facilitado y permitido formar parte de su grupo de investigación en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria, B-04 del Instituto de Neurobiología, y culminar la licenciatura de la mejor forma con la realización de esta tesis.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IN202414) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

De la misma forma agradezco a la Dra. Deysi Gasca Martínez, por su compañía, por ser guía y por sus valiosas sugerencias. A las M. en C. Cristina Siller y Paola Bello, por sus amistades, enseñanzas y constantes atenciones en revisiones de la presente tesis. A la M.V.Z. Norma Serafín López por su amistad y colaboración esencial para poder realizar este trabajo. A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso, la Sra. Bertha Islas Rivas y Martín García Servín por el apoyo técnico. Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio B-04. Rogelio, Antonio, Jazmín, Aleli, Eve, Cloy, Lupita, Dani, América, Renata, Rafa y demás integrantes, por los momentos agradables y de ocio.

A la fortaleza de mi familia, a mi padre Miguel, a mi madre Columba, a mis abuelos, hermanas, sobrinas y a todo el núcleo familiar. A mis amigos de siempre, Juan Manuel, Jorge, Luis, Elsa, Iris, Karen. A Arely y demás.

A la Dra. Berenice Silva, por haberme instruido en el área de las Neurociencias, al Maestro Guillermo Tello, por sus enseñanzas y meditaciones. Así como a las Antrop. Erika Sánchez Cruz y Sria. Ariadna Arzate Valdés por las facilitaciones en los trámites escolares.

Agradezco a Dios.

Y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por haberme adoptado durante ocho años, formándome como individuo ético, académico y social.

Los dioses han condenado a Sísifo a empujar sin cesar una roca hasta la cima de una montaña, desde donde la piedra volvería a caer por su propio peso. Han pensado que no hay castigo más terrible que el trabajo inútil y sin esperanza [...]

Toda la alegría silenciosa de Sísifo consiste en eso. Su roca es su cosa. Su destino le pertenece. Sísifo, el hombre absurdo dice que sí y su esfuerzo no terminará nunca. No hay un destino superior, o por lo menos no hay más que uno al que juzga fatal y despreciable. Por lo demás, sabe que es dueño de sus días. En ese instante en que el hombre vuelve sobre su vida, como Sísifo vuelve hacia su roca, en ese ligero giro, contempla esa serie de actos desvinculados que se convierten en su destino, creado por el, unido bajo la mirada de su memoria y pronto sellado por su muerte. [...]

¡Dejo a Sísifo al pie de la montaña! [...] Sísifo enseña la fidelidad superior que niega a los dioses y levanta las rocas. Juzga que todo está bien. Este universo por siempre sin amo, no le parece estéril, ni fútil. Cada uno de los granos de esta piedra, cada trozo mineral de esta montaña llena de oscuridad forma por sí solo un mundo. La lucha por llegar a las cimas basta para llenar un corazón de hombre. Hay que imaginarse a Sísifo feliz.

*El mito de Sísifo
Albert Camus*

DEDICATORIA

A mi abuelo:

Pedro Zamora Coix

Por su presencia y su discurso tatuado en la memoria.

A mis padres:

Columba Ursulo Oloarte

y

Miguel Zamora Lezama

Por concederme esperanza, fuerza y esencia.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	III
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Aprendizaje y Memoria	2
2.1.1 Memoria de Reconocimiento	6
2.2 Cuerpo Estriado	7
2.2.1 Citología del Estriado	9
2.2.2 Conectividad del Estriado	10
2.2.3 Participación del Estriado Dorsomedial en la Memoria.	12
2.3 Sistema Cannabinérgico	14
2.3.1 Endocannabinoides	14
2.3.1.1 Anandamida	15
2.3.1.2. Síntesis y Degradación de Anandamida	16
2.3.2 Receptores Cannabinérgicos	18
2.3.3 Sistema endocannabinérgico y Memoria	20
2.3.3.1 Sistema endocannabinérgico y Estriado dorsomedial	21
3. JUSTIFICACIÓN	24

4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Sujetos	26
6.2 Cirugía	26
6.3 Manipulación	27
6.4 Tarea de Reconocimiento de Objetos dependiente de lugar (ROdl)	27
6.4.1 Habitación	28
6.4.2 Entrenamiento y Prueba	29
6.5 Fármaco y Administración	30
6.6 Grupos y Tratamientos	30
6.7 Histología	30
6.8 Análisis Estadístico	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Verificación Histológica	32
7.2 Resultados estadísticos	33
8. DISCUSIÓN	37
9. CONCLUSIÓN	43
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44
ABREVIATURAS	50

RESUMEN

La Anandamida (ANA) es un endocannabinoide que se une al receptor CB1. El receptor CB1 se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (SNC) y se expresa considerablemente en estructuras involucradas en el aprendizaje y la memoria como son el hipocampo, el estriado, la sustancia nigra, la amígdala y la corteza prefrontal. Uno de los componentes de la memoria de reconocimiento es el recuerdo de la información espacial en la cual participa el estriado dorsomedial (EDM). Estudios previos proporcionan evidencia de que existe una facilitación en la consolidación de la memoria producida por la administración de URB57, inhibidor de hidrolasa de amida de ácidos grasos (FAAH) encargado de degradar a la ANA, lo cual sugiere que el sistema cannabinoide es necesario para llevar a cabo el efecto facilitador sobre la memoria. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de un endocannabinoide como tal sobre la región del EDM, la cual participa en tareas espaciales. La finalidad en este trabajo es investigar la posible modulación de la ANA en sobre la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos dependiente de lugar (ROdl). Para ello, se utilizaron ratas macho (*Wistar*) implantadas bilateralmente con cánulas en el EDM. Posteriormente se entrenaron en la tarea de ROdl. Los tratamientos se administraron inmediatamente después del entrenamiento, los grupos independientes fueron: vehículo (VEH) o tres dosis de ANA de 0.25, 0.5 o 1.0 µg/µL. Los resultados de este estudio mostraron que al administrar la dosis más baja de ANA (0.25 µg), las ratas presentaron ROdl aunque no se presentó ningún efecto facilitador, mientras que la dosis más altas de ANA (0.5 o 1.0 µg) no presentaron ROdl. Esto puede deberse a la inhibición de los sistemas de neurotransmisión glutamatérgico, colinérgico y dopaminérgico causado por los endocannabinoides. Por lo tanto, nuestros resultados proporcionan evidencia de que los endocannabinoides pueden influir en la codificación y consolidación de una tarea espacial y que además del hipocampo, también la región del EDM participa en este tipo de memoria.

1. INTRODUCCIÓN

Evolutivamente la aparición del sistema de receptores de cannabinoides está relacionada con la capacidad de nuestros patrones neuronales para ser modificados con la experiencia. (Whittle, Guy, Robson, 2001) Esta dialéctica memoria/olvido permite que una especie se adapte a situaciones cambiantes del entorno lo cual permite la evolución de las especies. En cuanto a la memoria es una cimentada relación entre las neuronas; aunque no es un proceso unitario, por ejemplo la memoria de reconocimiento requiere diferentes estructuras para la integración de la información (Squire, 2011). Por lo tanto los cannabinoides que produce nuestro propio cuerpo funcionan como moduladores entre estas conexiones para preservar la vida (Morena & Campolongo, 2014).

El sistema cannabínrgico endógeno se expresa ampliamente en el sistema nervioso central y en otros tejidos del organismo, actúa como modulador de distintas funciones biológicas. Se ha identificado en el cerebro un sistema cannabinoide endógeno compuesto por una serie de receptores, ligandos lipofílicos endógenos y enzimas encargadas de la biosíntesis y degradación de los endocannabinoides. (Piomelli, 2003)

Durante la última década se ha estudiado la participación de los cannabinoides endógenos en la modulación de la memoria. Se han encontrado efectos sobre las distintas fases de la memoria: adquisición, consolidación, evocación o extinción. Un elemento importante en la supervivencia de los individuos es la representación espacial del entorno en el que habitan. La memoria espacial se forma entonces, a partir de las asociaciones entre la información que se procesa interna y externamente. Una región que participa en la codificación de la memoria espacial es el estriado dorsomedial (EDM).. Sin embargo, aún no hay evidencias claras que evalúen la relación del sistema endocannabinoide en esta región del estriado, estructura relacionada con la memoria espacial.

2. ANTECEDENTES

2. 1. Aprendizaje y Memoria

El aprendizaje es el proceso por el cual adquirimos y codificamos nueva información y/o conocimiento y se manifiesta en el cambio relativamente permanente de la conducta mientras la memoria es el proceso por el cual la información es almacenada y consecuentemente accesible (McGaugh, 2000). Atkinson y Shiffrin (1968) proponen un modelo de aprendizaje y memoria el cual implica estas etapas: Codificación→ consolidación → evocación.

La codificación o bien adquisición de la memoria se refiere al proceso inicial de aprendizaje por el que la información física (memoria icónica, ecoica) se transforma en una representación mental almacenada (Delis & Kramer, 2000).

La consolidación o almacenamiento es el resultado de la adquisición el cual crea y mantiene un registro de información permanente. La evocación se refiere a la accesibilidad y utilización de la información almacenada para crear una representación consciente o ejecutar un comportamiento aprendido por ejemplo una acción motora

De esta forma, las fases de la memoria hacen posible caracterizar a este proceso según la duración de la retención. Es por ello que se distingue y divide la memoria en dos categorías: la memoria a corto (MCP) y a largo plazo (MLP). Por MCP se entiende como el recuerdo de información inmediatamente posterior a su presentación o su recuperación ininterrumpida, se la cree limitada en su capacidad. La MCP parece producirse por cambios en los circuitos neuronales, dichos cambios pueden implicar diferentes mecanismos celulares, por ejemplo, cambios en los sistemas de segundos mensajeros o cambios en las propiedades de los canales de las membranas de la neuronas. (Lechner, Squire & Byrne, 1999) Por otro lado, cuando se emplea la definición de MLP, se hace referencia al

recuerdo de información tras un intervalo largo. La MLP a diferencia de la MCP, va acompañada de cambios más permanentes que requieren la síntesis de proteínas y/o cambios en la estructura de la conectividad sináptica (Lechner et al., 1999) Y requiere necesariamente un proceso de consolidación. (Dudai, 2014) El concepto de consolidación de la memoria fue establecido por Müller y Pilzecker (1990), ellos propusieron que el aprendizaje no induce instantáneamente memorias permanentes, sino la memoria toma tiempo para ser fijada (McGaugh, 2000) (Fig. 1). La consolidación es el proceso de un sistema de almacenamiento de información lábil de temporalidad corta a un sistema viable de almacenamiento a largo plazo (Dudai, 2004).

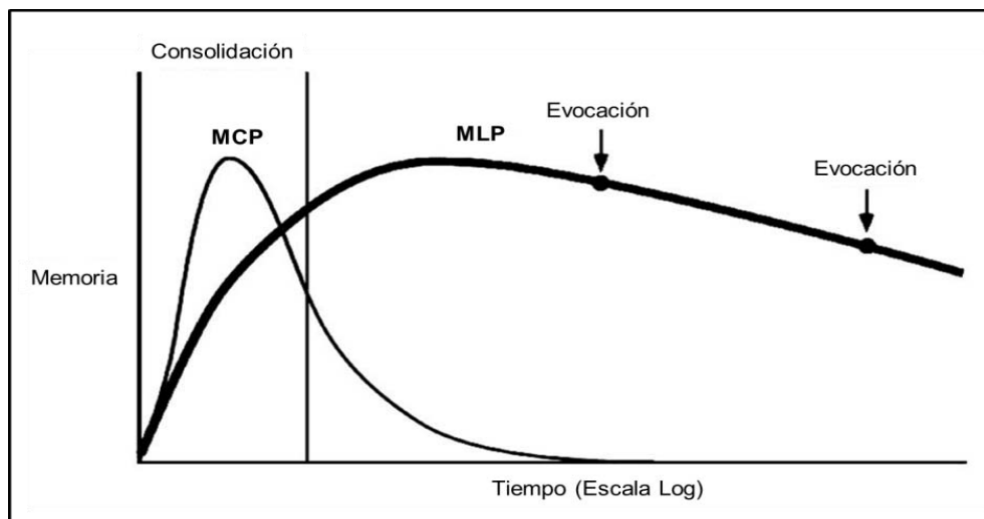


Figura 1. Curva en la que se muestra los procesos de aprendizaje y memoria (Adquisición, consolidación y evocación) en relación con la temporalidad. Modificado de Dudai 2004

La memoria es un proceso complejo que no se encuentra restringido a una sola área física anatómica, sino que involucra numerosas áreas del cerebro. El proceso de consolidación de la memoria declarativa depende del intercambio de información entre el hipocampo y diversas zonas corticales, a través de sistemas bidireccionales de conexiones corticales hipocampales (Squire, 2004). En el caso de la memoria procedimental, sus principales sustratos anatómicos de almacenamiento son estructuras subcorticales, como el *neocórtex* (caudado y putamen).

Como se ha mencionado anteriormente, existen diferentes tipos de memoria, cada una controlada por una parte diferente del cerebro, que a su vez interactúa con otras estructuras para codificar finalmente el tipo de memoria que se requiera. En este proceso interviene una serie de sistemas diferentes, dentro de los cuales se encuentra la interacción de estructuras como el hipocampo, el núcleo estriado, la amígdala, la corteza prefrontal, el núcleo accumbens, el cerebelo. (White & McDonald, 2002). La investigación sobre diferentes sistemas de memoria es relativamente reciente. La búsqueda de los múltiples sistemas de memoria empezó con el descubrimiento de que lesiones selectivas en zonas del cerebro resultaban en déficits severos de memoria sin embargo no afectaban en su totalidad. En este sentido, un ejemplo claro en la alteración de la memoria fue el caso clínico del paciente de amnesia estudiado por Brenda Milner, el señor Henry Gustav Molaison (H.M.), el cual después de la ablación del lóbulo temporal medial como tratamiento para epilepsia crónica, no presento ningún deterioro en sus capacidades intelectuales, sin embargo le provocó una amnesia anterógrada (incapacidad de formar nuevos recuerdos). (Milner, Squire & Kandel, 1998).

Se han planteado distintas clasificaciones de memoria, una de ellas es el de Squire & Zola (1996) quienes nombran las dos categorías que dividen a la MLP: a) declarativa o explícita y no declarativa o implícita; estas categorías son para uso específico en humanos.

La memoria declarativa o explícita es la información o conocimiento recordado de manera deliberada, flexible e implica la manipulación y asociación de información diferente de hechos o acontecimientos. La memoria explícita puede dividirse en memoria semántica que es el almacenamiento del conocimiento del mundo y memoria episódica que es la capacidad de volver a experimentar un evento en el contexto en el que se produjo originalmente (Squire, 2004) (Fig. 2).

La memoria no declarativa o implícita es la información que nos permite ejercer hábitos cognitivos y motores. Su recuerdo es de manera inconsciente, es rígida y

está vinculada a las condiciones en las que se produjo el aprendizaje (habituación, sensibilización o condicionamientos clásicos e instrumental) y/o a través de la memoria de procedimiento que son las habilidades motoras, cognitivas, perceptuales del sujeto. (Squire, 2004; Thompson & Kim, 1996)

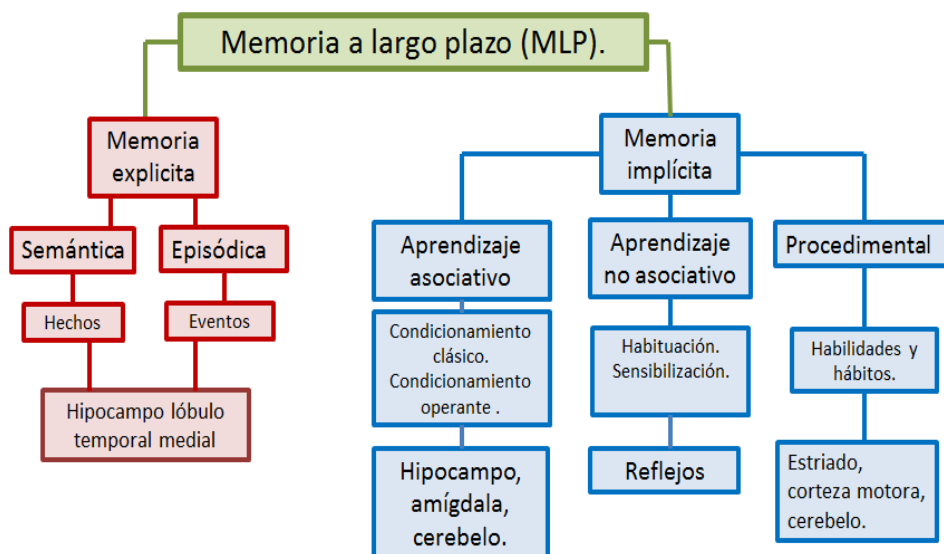


Figura 2. Clasificación de los sistemas de memoria de largo plazo y estructura asociada. (Modificada de Squire, 2004)

La memoria es un proceso complejo que no se encuentra restringido a una sola área física anatómica, sino que involucra numerosas áreas del cerebro. El proceso de consolidación de la memoria declarativa depende del intercambio de información entre el hipocampo y diversas zonas corticales, a través de sistemas bidireccionales de conexiones corticales hipocámpales (Squire, 2004). En el caso de la memoria implícita, de la memoria procedimental en particular, sus principales sustratos anatómicos de almacenamiento son estructuras subcorticales como el *neostriado* (caudado y putamen). Esto sugiere que el proceso de la memoria es extenso sin embargo no parece procesarse ni almacenarse en las mismas regiones cerebrales.

2.1.2 Memoria de Reconocimiento

La memoria explícita consiste en una variedad de procesos cognitivos en sustratos neurales disociables que se requieren para la integración de la información el cual se adquiere con pocas exposiciones al material que hay que aprender (Squire & Zola, 1996). La tarea de reconocimiento de objetos (RO) es un modelo ampliamente usado para evaluar la memoria explícita y el entendimiento de las bases neurobiológicas de la memoria de reconocimiento (Ennaceur & Delacour, 1988). El reconocimiento de un estímulo cobra importancia en el procesamiento de la memoria ya que los eventos novedosos atraen más la atención que los eventos familiares, además, la habilidad para responder a los eventos novedosos es fundamental para la supervivencia (Balderas, Rodríguez-Ortiz & Bermudez-Rattoni, 2015).

La memoria de reconocimiento es la habilidad para discriminar la familiaridad de las cosas previamente experimentales (Brown & Aggleton, 2001). El reconocimiento tiene dos elementos funcionales esenciales, por un lado el reconocimiento de la familiaridad de los estímulos, por el otro en el recuerdo de la información espacial de los eventos. Ennaceur y Delacour (1988) establecieron la tarea de RO con base en la inclinación natural de los roedores a explorar más el objeto novedoso que el familiar, libre de reforzadores primarios, como alimento y castigos que condicionen la conducta. Por lo regular en esta tarea se presentan en una primera fase dos objetos novedosos idénticos para que la rata se familiarice con ellos, y después de un tiempo, en la segunda fase se le presentan un objeto familiar (presentado en la primera fase) y un objeto novedoso. El comportamiento de reconocimiento es la preferencia de exploración por el objeto novedoso. Existen diferentes modificaciones al protocolo de la tarea de RO, una de ellas es la evaluación de exploración de los objetos en un lugar novedoso. Esta tarea está basada en una fase de adquisición, en la que se presentan dos objetos distintos y posteriormente, en la segunda fase se presentan los mismos objetos,

pero un objeto previamente presentado será movido de posición (Balderas, Rodríguez-Ortiz, & Bermudez-Rattoni, 2015).

Investigaciones previas en la tarea de RO han relacionado la participación de la corteza perirrinal con la novedad del objeto y el hipocampo con la codificación de un contexto específico (Balderas et al., 2008). Cuando la familiarización tiene lugar en una fase en la cual el ambiente contextual es novedoso, el hipocampo juega un papel inhibitorio en la consolidación de la memoria de reconocimientos de objetos. De esta manera, la memoria de reconocimiento permanece inalterada por la inactivación del hipocampo cuando la exploración inicial de los objetos ocurre en un ambiente familiar (Balderas et al., 2008). El hipocampo es importante para la memoria de reconocimiento de objetos a largo plazo pero la memoria puede adquirirse usando estrategias alternativas que involucran otras regiones del cerebro.

2.2 Cuerpo Estriado

El cuerpo estriado es el conjunto de estructuras aferente de los ganglios basales (GB) los cuales participan el control del movimiento y en funciones cognitivas. Los GB son un grupo de núcleos subcorticales interconectados de sustancia gris que se encuentran en el cerebro anterior. Están integrados por el cuerpo estriado –en primates la capsula interna separa al cuerpo estriado en núcleo caudado y putamen; en roedores no existe tal separación-, el globo pálido dividido en interno (GPi) y externo (GPe), el núcleo subtalamico (NST) y las dos porciones de la sustancia negra: la reticulada (SNr) y la compacta (SNc) (Voorn, Vanderschuren, Groenewegen, Robbins & Pennartz, 2004). (Fig. 3). El núcleo caudado está ubicado en ambos hemisferio del cerebro y tienen forma de C. Está compuesto de tres porciones: La cabeza tiene contacto con los ventrículos laterales, el cuerpo y la cola. El putamen es la porción más grande y lateral del estriado. (Fig. 3A). En roedores la parte dorsomedial del estriado corresponde al núcleo caudado en primates y la parte dorsolateral corresponde al putamen (Fig. 3B) (Tepper & Plenz, 2008)

El núcleo estriado es el núcleo de mayor tamaño de los GB, es la entrada principal de dichos núcleos y participa en la planeación y ejecución del movimiento, específicamente como un filtro selector y refinar de movimientos. (White & McDonald, 2002) Existen varios criterios neuroanatómicos y funcionales utilizados para subdividir al estriado en una región dorsal y una región ventral. Uno de ellos se basa en regiones neuroanatómicas definidas como el borde entre el núcleo accumbens y el complejo caudado putamen. Otro criterio para dividir el estriado es con base en su conectividad, que identifica al estriado dorsal como aquella región que posee conexiones con áreas sensorimotoras y el estriado ventral como la región que esta inervada por la corteza frontal y las regiones límbicas como el hipocampo y la amígdala. (Voorn et al., 2004). El estriado dorsal funcionalmente es heterogéneo ya que la región del EDM recibe proyecciones de áreas asociativas corticales como la prelímbica y el núcleo intralaminar del tálamo y modula la memoria espacial dependiente de hipocampo mientras la región del EDL recibe proyecciones de la corteza sensorimotora y participa en la consolidación de las asociaciones de estímulo-respuesta (Voorn et al. 2004)

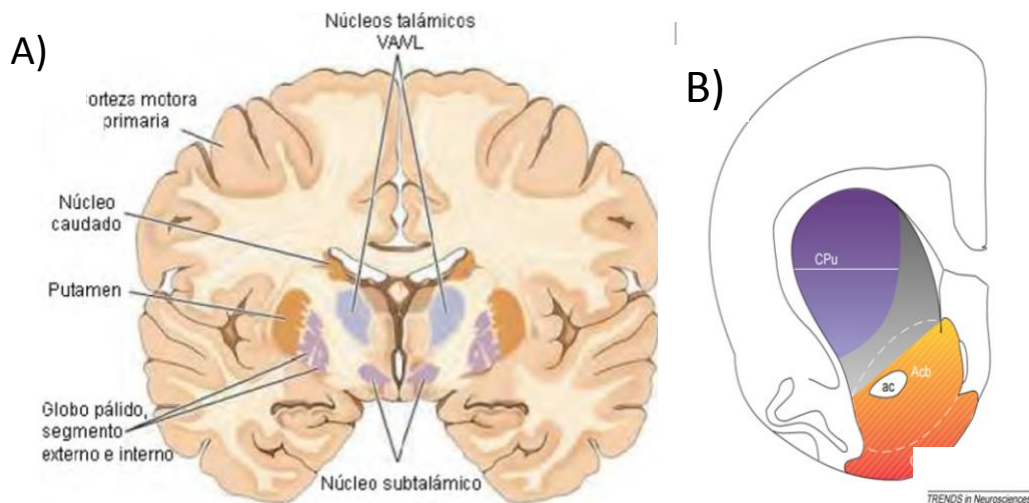


Figura 3. Descripción de los ganglios basales. A) Sección coronal que muestra los núcleos que componen a los ganglios basales. B) Diagrama de un corte coronal de rata en el cual se observa la subdivisión neuroanatomica del estriado; dorsal (CPu) y ventral (Acb y OT). La división por conectividad corresponde a los colores, la región dorsal corresponde al color violeta, la dorsomedial la gris y la ventral la naranja. Abreviaturas: ac, comisura anterior; Acb, núcleo accumbens; CPu, caudado-putamen; OT, tubérculo olfatorio. Modificado de Parente & Carpenter (1996); y Voorn et al. (2004)

2.2.1 Citología del Estriado

Las células que forman al estriado son diferentes y se distinguen por tamaño, espinas dendríticas y trayectorias axonales. El cuerpo estriado está formado en un 95% por neuronas espinosas medianas de proyección y el 5% restante son interneuronas (Wilson, 2004). Se han identificado dos categorías de neuronas espinosas medianas de proyección:

Tipo I. Son de soma esférico o poligonal con ramas secundarias y terciarias cubiertas de espinas. En estas neuronas se han identificado varios péptidos, como la sustancia P, dinorfina y encefalina, además de Ácido γ -aminobutírico (GABA).

Tipo II son escasas, la extensión de sus dendritas es mayor en comparación al tipo I y liberan las mismas sustancias (Wilson, 2004)

Las interneuronas del estriado se pueden dividir en dos grupos: Las interneuronas que sintetizan acetilcolina (ACh), son células no espinosas más abundantes, entre 1-3%; Y las que sintetizan GABA, sin embargo este último grupo se han subdividido en tres tipos diferentes:

Interneuronas que expresan parvalbúmina y GABA, tienen soma oval, muestran potenciales de acción muy rápidos, de duración corta (300 Hz), están escasamente ramificadas y son inmunorreactivas a GABA y descarboxilasa del glutamato.

Interneuronas que expresan somatostina, neuropéptido Y y GABA, su soma es fusiforme, su tamaño es mediano, tienen dendritas de bajo umbral de disparo, son inmunorreactivas a la diaforasa NADPH (nicotinamida adenina fosfato dinucleótido)

Interneuronas GABAérgicas que expresan calretinina que son neuronas pequeñas sin espinas. (Kreitzer & Malenka, 2008).

Tanto las neuronas de proyección espinosas como las interneuronas muestran un patrón muy característico de actividad espontánea. El potencial de membrana de las neuronas espinosas varía entre un estado hiperpolarizado

cercano a -80mV y un estado despolarizado cercano a -50mV, en cuanto a las interneuronas comparadas con las neuronas espinosas, las interneuronas muestran un potencial de reposo de membrana despolarizado entre -55mV y -60 mV y post hiperpolarizaciones lentas debido a la presencia de un voltaje de alto umbral activada por calcio. Todas con la posibilidad de disparar en ráfaga. (Tepper & Plenz, 2008) Como resultado de la conectividad de las distintas neuronas en el estriado con diversas regiones corticales y límbicas, se ha postulado que el núcleo estriado ejerce una función integradora por medio de la convergencia de información para la ejecución de conductas dependientes del aprendizaje espacial mediado por regiones dorsomediales. (White & McDonald, 2002).

2.2.2 Conectividad del Estriado

Los GB son parte de un circuito que adquiere información de la corteza cerebral, la procesa y proyecta nuevamente a la corteza a través de circuitos cortico-estriado-tálamo-cortical. El estriado posee eferencias a través del GPi a los núcleos talámicos que proyecta a las áreas motoras de la corteza prefrontal. Las conexiones eferentes del estriado muestran que los GB no controlan directamente el movimiento sino que lo coordinan a través de inter-conexiones con áreas motoras, premotoras y prefrontales que participan en la planeación y ejecución del movimiento.

La principal aferencia a los GB se origina en el estriado a través de proyecciones glutamatérgicas provenientes de áreas corticales sensoriales y de áreas corticales motoras y prefrontales. Una importante aferencia al estriado es la proyección dopaminérgica proveniente de la SNr que inerva al caudado-putamen y modula la actividad de los circuitos estriatales a través de receptores de la familia D1 que incrementan la respuesta glutamatérgica cortical y la familia de receptores D2 que la disminuyen (Fig. 4). También el estriado recibe aferencias de los NST que hacen relevo en el GPe para enviar su proyección GABAérgica al estriado. Por último el estriado recibe aferencia glutamatérgicas de los núcleos talámicos a

través de fibras provenientes de diversa regiones de la corteza sensorial motora, premotora y frontal. (Kreitzer & Malenka, 2008)

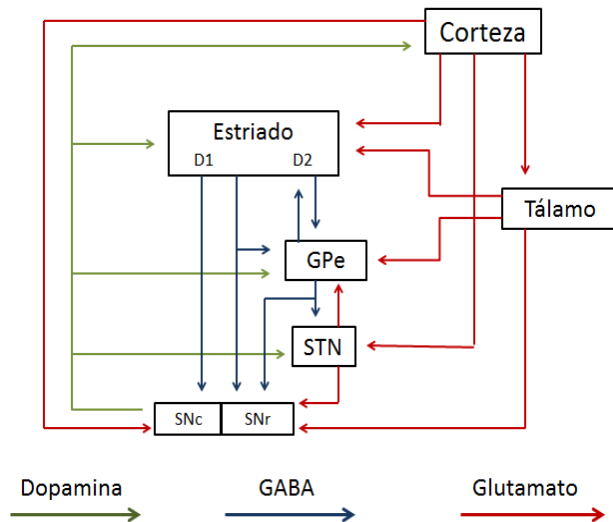


Figura 4. Conexiones neuroanatómicas del estriado, el cual como parte de los ganglios basales recibe información de varias regiones de la corteza y proyecta a la corteza motora modulando la ejecución motora y memoria espacial. GPe, Globo pálido externo; STN, Núcleos Subtalamicos; SNC, Sustancia nigra compacta; SNr, Sustancia nigra reticulata. Modificado de: Gurney, Prescott, Wickens & Redgrave, (2004).

Las eferencias estriatales de neuronas medianas espinosas viajan a través de dos vías: La vía directa proyecta al GPi y la SNr, que a su vez proyectan axones núcleo motor del tálamo. La vía indirecta proyecta hacia el GPe que a su vez proyecta a los NST y estos envían axones al GPi y SNr. (Kreitzer & Malenka, 2008).

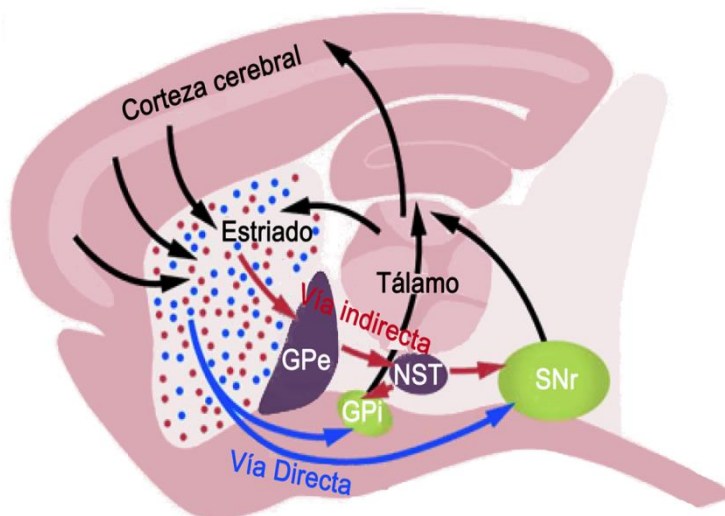


Figura. 5 Representación gráfica de un corte de cerebro de ratón en cual se describen las dos vías de eferencias estriatales: La vía directa proyecta al globo pálido interno y la sustancia negra reticulata y estos a su vez a tálamo. La vía indirecta proyecta hacia GPe que proyecta a los NST , este a GPi y SNr, para enviarla a tálamo. GPe, Globo pálido externo; GPi, Globo pálido interno; NST, Núcleo subtalamico; SNr, Sustancia nigra parsreticulada. Modificado de Kreitzer & Malenka (2008)

Como resultado de la conectividad del estriado con diversas regiones corticales y límbicas se sabe que el estriado ejerce una función integradora por medio de la confluencia de información sensorial, motora y límbica para la ejecución de conductas motoras dependientes del aprendizaje de procedimiento mediadas por la región dorsolateral, del estriado (EDL) aprendizaje espacial mediado por regiones del estriado dorsomedial (EDM) (White & McDonald, 2002).

2.2.3 Participación del estriado dorsomedial en el aprendizaje y la memoria.

Muchos estudios han demostrado que el aprendizaje y la memoria espacial son mediados por estructuras entre las cuales el hipocampo y estriado dorsal son de suma importancia. Se ha reportado que la funcionalidad del estriado en el aprendizaje y la memoria depende de sus conexiones neuroanatómicas: la región del EDL está involucrada en el aprendizaje de procedimiento y la del EDM está relacionada con la modulación de ciertos aspectos de la memoria espacial (Devan & White, 1999; Featherstone & McDonald, 2005.)

Las primeras investigaciones que mostraron participación entre el aprendizaje y la memoria espacial fueron descritas por Wishaw (1987). El experimento consistió en lesionar el EDM con ácido iboténico antes del entrenamiento en la tarea de laberinto acuático de Morris. Las ratas con lesiones en el EDM previas a la fase de entrenamiento mostraron un deterioro en la adquisición de la tarea en comparación con controles pero al sobre-entrenarlas en la misma tarea tenían el mismo desempeño que las ratas control. Los resultados hacen evidente la funcionalidad del estriado dorsal debido a que la región del EDM participa en el aprendizaje, además que en condiciones de sobre-entrenamiento las estrategias de navegación por ratas lesionadas en EDM eran similares a los controles, esto sugiere que en etapas tempranas de aprendizaje, el EDM crea representaciones estímulo-estímulo la cual cobran menos importancias conforme se incrementa las sesiones de entrenamiento como resultado de la formación de una representación estable de asociaciones de hipocampo (Wishaw, 1987)

Una de las funciones del estriado en el aprendizaje y la memoria es mediar hábitos o asociaciones estímulo-respuesta. En este sentido, Packard, Hirsh, y White (1989) plantearon la probabilidad de distintos sistemas anatómicos de la memoria en mamíferos, esto lo demostraron con la disociación de las funciones mnemónicas del hipocampo y el estriado con lesiones en la región dorsal del estriado o la fimbria-fórnix en ratas que entrenaron en dos versiones de laberinto radial. Encontraron que las ratas lesionadas en la fimbria-fórnix fueron mejores en elegir la tarea de memoria de procedimiento, mientras que las lesionadas en el estriado dorsal no desempeñaron bien la tarea de laberinto radial la cual evalúa memoria espacial.

También existe una disociación funcional entre el EDL y EDM la cual fue estudiada en ratas con lesiones en el EDL o EDM en la tarea de laberinto acuático de Morris. Este estudio mostró que las ratas que tuvieron lesiones en el EDL tuvieron un incremento significativo en la selección de la estrategia espacial, mientras las ratas con lesiones en EDM produjeron una preferencia por la estrategia de procedimiento. Estos hallazgos aportan evidencia de que el EDM participa en la selección de estrategias de navegación espacial que compiten en forma paralela con las estrategias de navegación de procedimiento dependientes del EDL. (Devan & White, 1999)

Estudios recientes muestran que al bloquear receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) en el hipocampo dorsal y en el EDM producen deterioro en la memoria de largo plazo en una tarea espacial del laberinto acuático de Morris lo cual refuerza la intervención de EDM en procesos de aprendizaje y memoria espacial. (Holahan et al., 2005)

2.3 Sistema Cannabinérgico

El estudio de la señalización del sistema cannabinérgico inició con el descubrimiento de moléculas denominadas endocannabinoides y el hallazgo de receptores de cannabinoides a los cuales se les unen selectivamente estas moléculas. Este sistema mantiene rutas bioquímicas complejas para la síntesis, liberación, transporte y degradación de los endocannabinoides

2.3.1 Endocannabinoides

Con el descubrimiento de los receptores a cannabinoides suponía la existencia de sustancias químicas endógenas capaces de unirse a ellos y mediar respuestas fisiológicas, estos fueron los endocannabinoides. La mayoría de estas moléculas endógenas son derivadas del ácido araquidónico, un lípido que forma parte de la membrana celular. En el año 1992 se pudo aislar el primer compuesto endocannabinoide a partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo: la araquidonil- etanolamida, nombrada Anandamida (ANA) (del sanscrito *ananda* que quiere decir “felicidad interior” y amida por el enlace químico distintivo de agonista exógeno) (Devane et al.,1992). En 1995 se descubrió el 2-araquidonilglicerol (2-AG), aislado del intestino canino. Es así como se demostró que tanto la ANA como el 2-AG tenían propiedades similares al tetrahidrocannabinol, conocido como THC (Mechoulam, 2002). Ambos endocannabinoides se unen a los receptores CB1 y/o CB2, sin embargo la ANA tiene mayor afinidad por el CB1 (Felder et al. 1993). Existen compuestos endocannabinoides descubiertos recientemente que aunque no todos se unan a receptores CB1 o CB2 presentan funcionalidad cannabinoide (Tabla 1).

Endocannabinoides	Nombre común	Receptores cannabinoides y propiedades funcionales
N-araquidoniletanolamida	Anandamida	Agonista Parcial CB1, agonista limitado en CB2.
2-araquidoniglicerol	2-AG	Agonista completo de CB1 y CB2
Cis-9-10-octadecenoamida	Oleamida	Agonista CB2, Agonista limitado CB1
N-oleoiletanolamida	OEA	Agonista TRPVI
2-araquidonilgliceril éter	Noladin Eter	Agonista a CB1
O-araquidonioiletanolamida	Virodamina	Agonista Parcial CB2 y antagonista CB1
N-Araquidonildopamina	NADA	Agonista CB1 y agonista potente TRPVI

Tabla 1. Diferentes tipos de cannabinoides endógenos descritos. Muestra el nombre común de cada endocannabinoide, sus propiedades funcionales y los tipos de receptores a los que se unen.

2.3.1.1 Anandamida

La ANA es un agonista endocannabinoide parcial o total de los receptores a cannabinoides. Se ha estimado que la concentración de ANA en cerebro de rata oscila entre 4 y 40 pmol/g de tejido y en humanos 148 pmol/g de tejido (Felder et al., 1996) Los niveles de ANA en el SNC son bajos, 200 veces menos que la concentración de 2-AG (Sigiura et al., 1995). En cuanto a los niveles de ANA en el cerebro, son equivalentes a los de los neurotransmisores como dopamina y serotonina, pero considerablemente más bajo que los de GABA y glutamato . Aunque no entran en la definición de neurotransmisores clásicos debido a que no son almacenados en vesículas y son lipofílicos. Así, la ANA se produce en la membrana seguida de su liberación en demanda. (Ameri, 1999). Asimismo se ha reportado que la ANA cumple las mismas propiedades farmacológicas y funcionales que el THC: catalepsia, antinocicepción e hipotermia (Romero, Garcia, Fernandez-Ruiz, Cebeira, & Ramos, 1995).

2.3.1.2 Biosíntesis y Degradación de la Anandamida

Casi todos los endocannabinoides son sintetizados en la membrana celular a partir de lípidos y liberados desde las neuronas únicamente en respuesta a un estímulo. Se unen a receptores de membrana para provocar sus acciones y son inactivados mediante degradación enzimática en el interior. Al activar al CB1 o CB2 inhiben la liberación de neurotransmisores como el GABA o el glutamato. Todo este proceso descrito necesita un mecanismo para sintetizar, desplazar, degradar y reducir la concentración de compuestos endógenos.

La ruta metabólica para la síntesis de la ANA más certera desde un punto de vista fisiológico es la que sugiere que el endocannabinoide procede de un precursor fosfolípido de la membrana celular. La síntesis (Fig 6.) comienza con la catálisis de dos fosfolípidos, la fosfatidil etanolamina (PE) y la fosfatidil colina (PC), que por medio de la enzima N-aciltransferasa une el ácido araquidónico de la PC a la cabeza del grupo de la PE (NAT) dando como resultado a N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Esto da paso a la hidrólisis de la NAPE por medio de la actividad de la enzima fosfolipasa D (PLD), la cual produce ANA y ácido fosfatídico, este último reciclado para producir glicerol. (Piomelli, 2003)

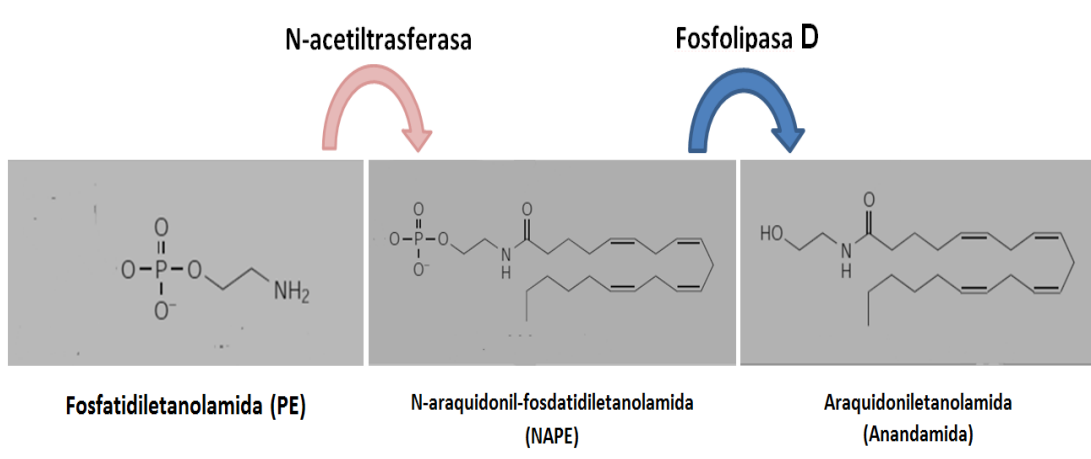


Figura 6. Vía de la síntesis de ANA. Modificado Piomelli (2003)

Tras la liberación de la ANA al espacio sináptico, su duración es corta y es captada rápidamente (Beltramo 1997). Se ha contemplado a los diferentes tipos celulares para la captura de ANA. En un inicio se contemplaba que la inactivación de ANA era por difusión simple, dada su naturaleza lipófila. Posteriormente se especuló con el transportador de membrana de ANA (TAM). Sin embargo el TAM no ha sido aislado ni clonado, causa por la cual algunos autores han mostrado rechazo sugiriendo la hidrólisis de la ANA a partir de la enzima FAAH (McKinney & Cravatt, 2005), encargada de la transformación de ANA en el ácido araquidónico y etanolamina, y de la reducción de la concentración intracelular de ANA (Bisogno et al., 2005).

La FAAH es una proteína integral de 597 aminoácidos, se encuentra acoplada a la membrana celular en su cara intracelular y se ha podido localizar en cuerpo celulares, dendritas de células de hipocampo, corteza cerebral, núcleo estriado (Egertova et. al., 1998). La FAAH se hallado en el cerebro de rata específicamente en el estriado, el hipocampo, el tálamo, las células endoteliales y el sistema inmune. Se han generado ratones Knockout de la FAHH los cuales muestran disminución en la hidrólisis de ANA y otros FAAs (ácidos grasos amidados) lo que indica que esta proteína es la principal para degradar estos lípidos *in vivo*. Se han observado los mismos efectos al administrar un inhibidor de la FAAH. Con lo anterior se confirma su papel modulador de la actividad del sistema cannabinérgico (McKinney & Cravatt, 2005)

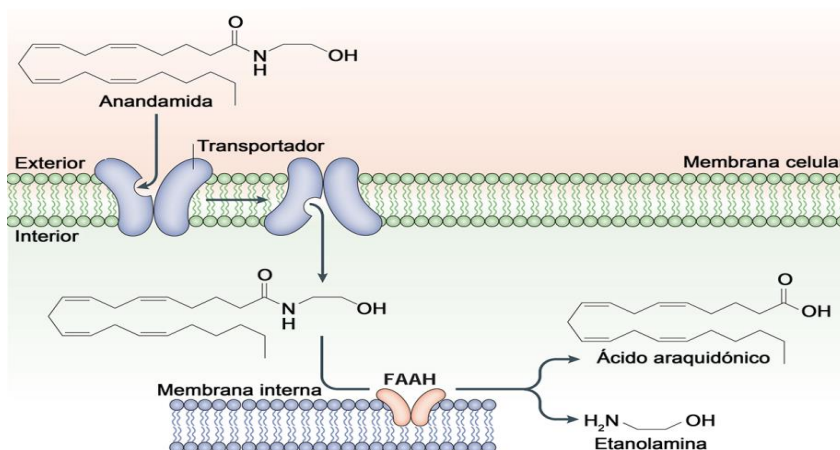


Figura 7. Mecanismo de desactivación de los endocannabinoides. La ANA es introducida por su transportador de membrana (TAM). Posteriormente se hidroliza por distintas hidrolasas de serina o por la enzima FAAH. Modificado Piomelli (2003)

2.3.2 Receptores Cannabinoides.

A finales de la década de los 70's se creía que el agente psicoactivo de la marihuana, específicamente la molécula cannabinoide exógena conocida como delta-9-tetrahidrocanabinol (THC) y agonistas cannabinoides interaccionaban directamente con la membrana celular debido a su naturaleza altamente lipofílica sin embargo el primer experimento que demostró la existencia de sitios específicos para cannabinoides fue descrito por Harris, Carchman & Martin (1978). En 1988 se inició la caracterización bioquímica y genética del primer receptor cannabinoide, el CB1. (Devane et al., 1992) Después del descubrimiento del receptor CB1 se ahondo en el conocimiento de sus propiedades y estructura. En 1990 se demostró que el receptor CB1 se encuentra localizado en el SNC a partir de su clonación (Matsuda et al., 1990), en 1991 se caracterizó el receptor CB1 en humanos a partir de tronco cerebral (Gerard, Mollereau, Vassart & Parmentier, 1991). Dos años después fue caracterizado el receptor CB2 a partir de células mieloides de bazo de rata (Munro, Thomas & Abu-Shaar, 1993)

Los receptores cannabinoides son proteínas asociadas a las superfamilia de proteínas G y presentan 7 dominios transmembranales hidrofóbicos. Todos los receptores CB1 están constituido por 472-473 aminoácidos con un 97% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Gerard et al., 1991); el receptor CB2 es análogo en un 44% respecto al receptor CB1 y en un 68% en dominios transmembranales (Bisogno, Ligresti & Di Marzo, 2005). El receptor CB1 está ampliamente expresado en el SNC como corteza frontal, hipocampo, GB, SNr, cerebelo (Fig. 8) aunque también se ha localizado en otros sistemas y tejidos como en las amígdalas, el bazo, el corazón, los testículos y los ovarios. (Ross R. et al., 2001) Mientras el receptor CB2 se ubica principalmente en células y tejidos del sistema inmune específicamente en linfocitos B y T, aunque se ha reportado la presencia del recetor CB2 en el SNC como en el cerebelo, tubérculo olfatorio, colículo inferior y región parvocelular del núcleo vestibular medial, pero de manera muy limitada (Onaivi, 2006)

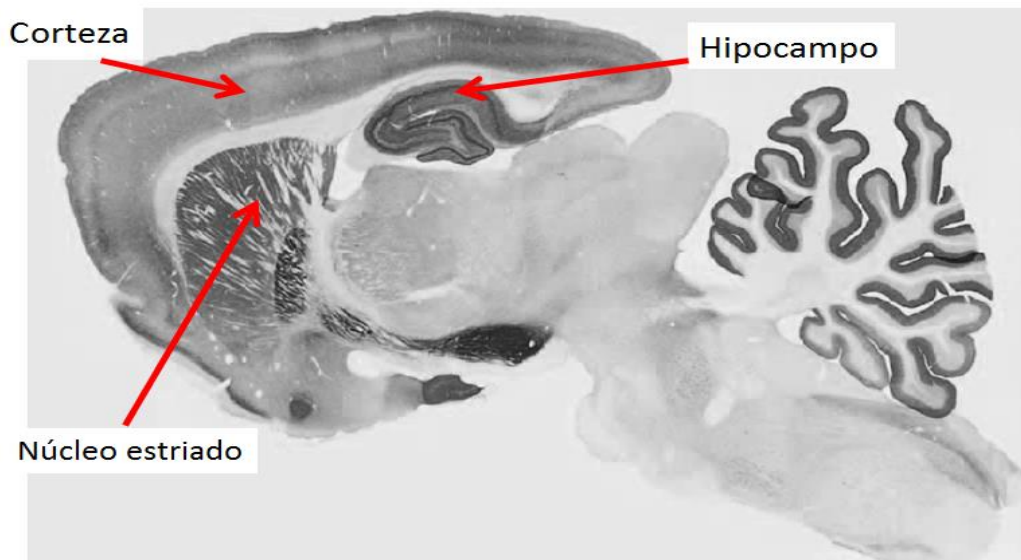


Figura 8. Inmunohistoquímica del receptor CB1. Corte sagital de cerebro de rata, el cual representa en las regiones más oscuras la ubicación del receptor en mayor proporción. Modificado de Martínez et al. (2003)

Los receptores cannabinoides pueden actuar de diferente forma tras la activación por un ligando:

Una de ellas es debido a la asociación con proteínas G de tipo inhibitorio. Esta asociación provoca una reacción inhibitoria de Adenilato Ciclasa (AC) por el efecto de la subunidad alfa de la proteína G, esto produce una disminución en la síntesis de Adenosin Monofosfato cíclico (AMPC) (Prather, Martin, Breivogel & Childers, 2000).

Otro mecanismo es por la regulación de canales iónicos. Únicamente el receptor CB1 es capaz de modificar el estado de los canales iónicos de calcio y potasio. El dímero $\beta\gamma$ de la proteína G activa los canales de potasio (Mackie, Lai, Westenbroek & Mitchell, 1995). En cambio inhibe los canales de calcio tipos N- y P/Q que perjudica la liberación de neurotransmisores (Felder et al., 1995) (Fig. 9). También se ha descrito que los receptores endocannabinoides pueden activar las vías de las cinasas PKB/Akt a través de la proteína G en su subunidad $\beta\gamma$. Por lo tanto esta vía de transducción resulta importante para el control del crecimiento, supervivencia y transformación maligna de las células (Vivanco & Sawyers, 2002)

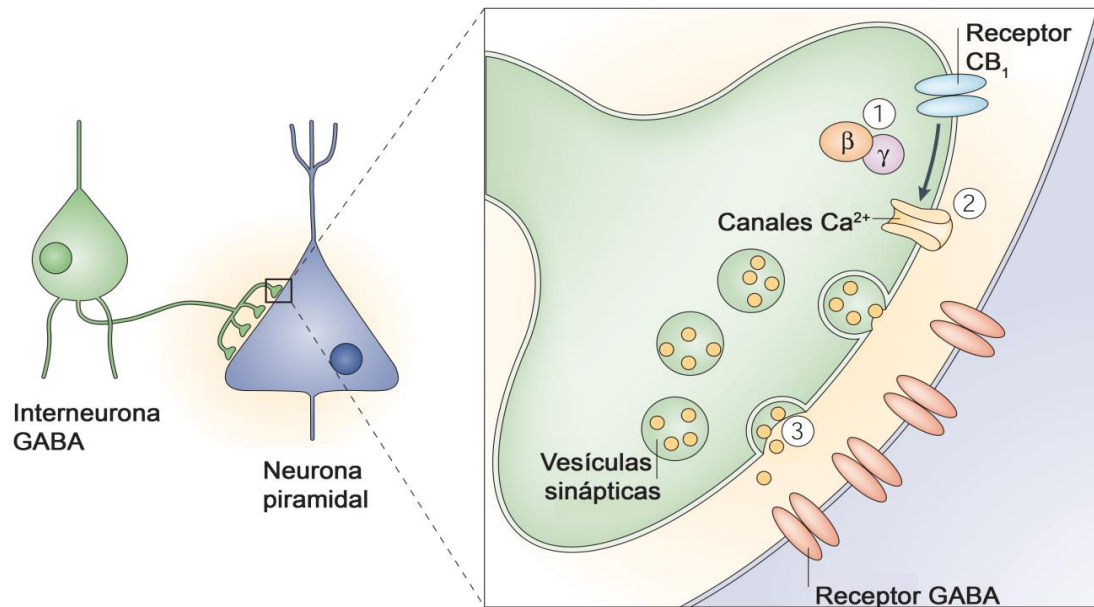


Figura 9. Regulación de canales iónicos presinápticos activados por CB1. Sinapsis entre la interneurona GABA y célula piramidal CA1 del hipocampo, los receptores CB1 pueden iniciar una serie de eventos intracelulares, que incluyen la activación de la proteína G y sus subunidades β y γ , el cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje y la inhibición de la liberación de GABA. Modificado Piomelli (2003)

Se ha descrito un mecanismo intracelular cannabinomimético de la ANA para otro tipo de receptores distintos a los CB1 Y CB2 el cual consiste en unirse a un tipo de canal catiónico activado por capsaicina, el receptor vaniloide VR1/TRPV1. Unión que desencadena en un aumento en la entrada de calcio en la célula (Olah, Karai & Iadarola, 2001).

Asimismo, los endocannabinoides pueden aumentar la expresión del óxido nítrico (ON) que actúa como neurotransmisor retrógrado en la plasticidad sináptica y en la relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos a través de la activación de la óxido nítrico sintasa constitutiva (ONSc) (Fiamiani C. et al., 1999). Todas las vías descritas pueden tener la expresión/inhibición de determinados genes. Refiriendo a la modulación de diferentes factores de transcripción específicamente la interacción de receptor cannabinoide y agonista y su control que puede tener en la expresión de algunos genes como Krox-24, Krox-20 y Juan-B, (Bouaboula et al., 2005)

2.3.3. Endocannabinoides y memoria

El sistema endocannabinoide ejerce su función en la modulación del aprendizaje y la memoria en áreas cerebrales como el hipocampo, el núcleo estriado y la corteza prefrontal. Los efectos que pueden provocar los cannabinoides sobre el aprendizaje y la memoria son múltiples (Sullivan, 2000). Existen teorías que describen el probable papel de los endocannabinoides en el deterioro de la memoria, o bien la formación de la memoria mediante consolidación de la memoria. Los mecanismos fisiológicos por los cuales los cannabinoides modulan diferentes sistemas de neurotransmisión se relacionan con su interacción sobre otros sistemas de neurotransmisión. (Fig. 10)

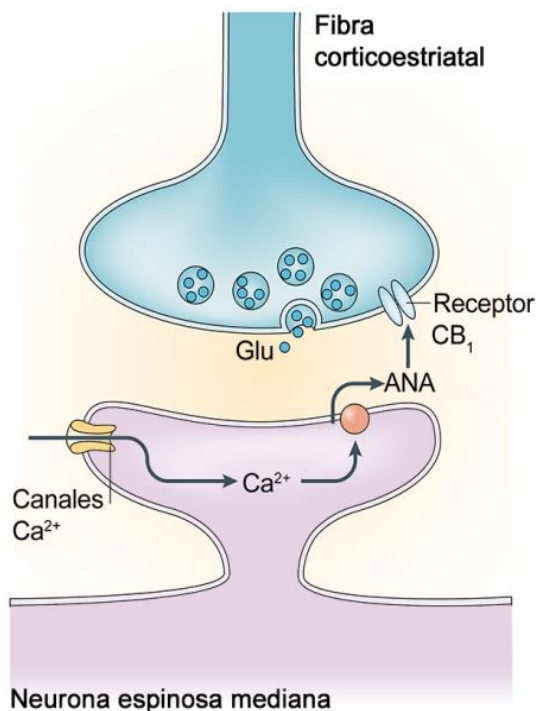


Figura 10. Rol de los endocannabinoides en la plasticidad sináptica a largo plazo. La activación repetitiva de fibras corticoestriatal causa una reducción persistente de la liberación de glutamato, llamado depresión a largo plazo (LTD), lo que podría ser mediado por la ANA. Las concentraciones elevadas de Ca²⁺ producidas en espinas postsinápticas de neuronas estriatal-medial después de una estimulación podría desencadenar la formación de la ANA, que a su vez puede inducir LTD por receptores CB₁ en terminales de los axones glutamatérgicos Modificado de Pionelli (2003)

2.3.3.1 Sistema endocannabinérgico y el núcleo estriado

Los receptores CB1 se expresan en niveles altos en los GB, en gran parte en el núcleo estriado y están localizados en tres distintos elementos neuronales: en terminales glutamatergicas, interneuronas GABAérgicas y neuronas espinosas medianas. (Pilloni, 2003). Se ha mostrado que la mayor expresión se encuentra en la región dorsolateral, que como hemos mencionado en el apartado de memoria, participa en el almacenamiento de información implícita. En el estriado dorsolateral se ha podido demostrar que el CB1 se encuentra en grandes cantidades a nivel presináptico y postsináptico (Kofalvi et. al., 2005).

El desarrollo en el estudio molecular del sistema cannabinérgico ha abierto nuevas líneas de investigación, implicadas en la producción de nuevos fármacos o modelos de ratones transgénicos carentes de alguna proteína implicada en el sistema cannabinérgico. Por ejemplo se ha demostrado que los ratones “knockout” del CB1 muestran curvas de aprendizaje igual a las de los ratones normales en la versión clásica del Laberinto acuático. Sin embargo en la versión de aprendizaje en reversa de la misma tarea en la cual la plataforma se mueve al lado opuesto del tanque, los sujetos continúan acudiendo a el lugar donde se encontraba originalmente la plataforma, esto muestra que los endocannabinoides pueden participar en la extinción (Varvel & Lichtman, 2002).

Estudios previos han proporcionado evidencia de que la administración de los fármacos cannabinoides modulan la consolidación de la memoria. El agonista cannabinoide sintético WIN55,212-2, administrado en la amígdala inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, mejora la consolidación de la memoria (Campolongo et. al. 2009). También la administración sistémica de WIN55,212-2 en ratas entrenadas bajo una condición de alta excitación mejoró la memoria de reconocimiento de objetos a largo plazo (Campolongo et. al., 2013).

Recientemente se ha demostrado en la tarea de evitación inhibitoria que un choque eléctrico fuerte (0.45 mA) produce un aumento de ANA en la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal en comparación con grupos control. Posteriormente en este mismo trabajo también se administró después del entrenamiento el inhibidor de la FAAH, URB597, y posteriormente un antagonista al receptor CB1, AM251, en el hipocampo. Se encontró que el inhibidor URB597 aumenta los niveles de ANA y la activación de receptores CB1, mejorando la consolidación de la memoria; mientras que cuando se bloquea el receptor con el antagonista AM251, perjudica la consolidación de experiencias aversivas. (Fig. 11) Postulando que la liberación endógena del endocannabinoide ANA mejora la consolidación de la memoria y esa mejora de la memoria depende de las interacciones funcionales entre diferentes regiones del cerebro (Morena & Campolongo, 2014).

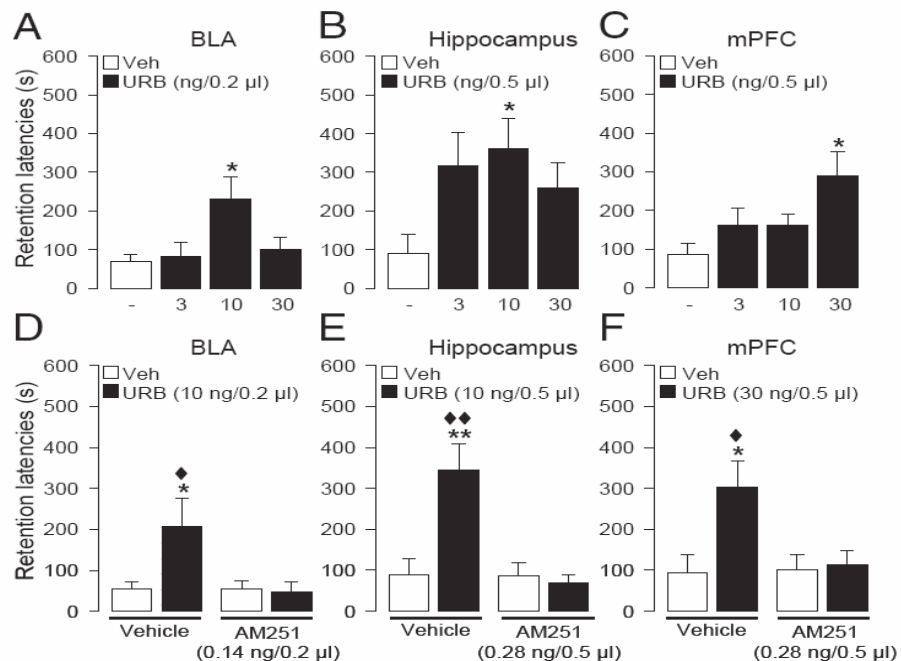


Figura 11. Efectos de la infusión de URB597 (URB; 3, 10 o 30 ng), inhibidor de FAAH, en amígdala basolateral (BLA)(A), hipocampo(B), o corteza prefrontal (mPFC)(C) después del entrenamiento (48-h), el cual muestra una mejora en la consolidación de la memoria. La posterior administración de una dosis de AM251 (0.14 o 0.28 ng) bloqueó los efectos que mejoran la memoria de URB597 (10 o 30 ng) en el BLA (D), hipocampo (E) , o mPFC (F). * P < 0,05 , ** P < 0,01 vs. Grupo vehículo (Veh); ♦ P < 0,05, ♦♦ P < 0,01 vs. Grupo correspondiente a AM251. Resultados representan la media ± error estándar (n = 8-13 por grupo)

3. JUSTIFICACION

El sistema cannabinérgico endógeno esta conservado a través de la evolución, lo cual implica que dicho sistema posee una potencial relevancia fisiológica. El sistema cannabinérgico es un complejo modulador, presente en el sistema nervioso central y otros tejidos, importante para los cambios conductuales, moleculares y del mantenimiento de la homeostasis del organismo. Los principales efectos fisiológicos producidos son: control de la actividad motora; control de la ingesta de alimento; regulación del sueño; efectos sobre la nocicepción; regulación de las funciones neuroendocrinas mediadas por la síntesis y liberación de hormonas de la reproducción; control de la ansiedad y modulación emocional; y efectos sobre el aprendizaje y memoria. Actúan en los procesos antes mencionados de modo dosis-dependiente.

Durante la última década se han sintetizado moléculas agonistas y antagonistas de los receptores a cannabinoides. Algunas se han reservado para investigación básica y otras se han comercializado para uso terapéutico, incluyendo alteraciones del sueño y del movimiento como la epilepsia, el Parkinson, el Alzheimer así como la estimulación o control del apetito en pacientes con enfermedades como SIDA, cáncer, anorexia u obesidad sin olvidar su eficacia analgésica. Por otra parte uno de los efectos de los cannabinoides más claramente descritos es el efecto en los procesos de aprendizaje y memoria, ya que son múltiples los efectos que pueden provocar aunque aún no se sabe los distintos mecanismos y estructuras que implican estos procesos.

Es por ello que actualmente es uno de los sistemas con mayor interés de estudio debido al creciente conocimiento de su participación en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Es de gran importancia entender los modos de acción farmacológica de estos mediadores lipídicos para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

4. HIPOTESIS

La administración de anandamida en la región del estriado dorsomedial después del entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objeto dependiente de lugar, facilitará la consolidación de la memoria.

5. OBJETIVOS

General.

Investigar el efecto de la activación de los receptores a endocannabinoides con el agonista anandamida en la región del estriado dorsomedial sobre la consolidación de la memoria en la tarea de reconocimiento de objeto dependiente de lugar.

Particular.

Evaluar el efecto de diferentes dosis de ANA (0.25, 0.5 y 1.0 μg) en la región del estriado dorsomedial sobre la memoria de reconocimiento dependiente de lugar.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

Los procedimientos experimentales de la presente tesis fueron aprobados para su realización por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM, de acuerdo con la Norma Mexicana Oficial NOM-062-ZOO-1999 para la producción, uso y cuidado de animales experimentales y las normas establecidas en la “Guide for Care and Use of Laboratory Animals del NIH (ILAR, 2011).

6.1 Sujetos.

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Wistar* con un peso entre 250-300g. obtenidas del Bioterio del INB-UNAM. Se alojaron individualmente en cajas de acrílico transparente, en condiciones controladas de luz-obscuridad (12:12, 7:00 am.-7:00 pm.), temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) con agua y alimento *ad libitum*.

6.2 Cirugía.

Los animales llegaron al bioterio del laboratorio de aprendizaje y memoria cuatro días previos a la cirugía estereotáxica. Todos los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal (i.p.) con pentobarbital sódico (50 mg/kg). Además se administró atropina (i.p. 0.4 mg/ml) para reducir la congestión en las vías respiratorias y permitir una adecuada ventilación. Se rasuró la zona dorsal de la cabeza y se fijó a la rata en un aparato esterotáxico. Posteriormente se le realizó una incisión sagital (2 cm.) y se retiró el periostio con el objetivo de tener visible el bregma. Una vez ubicado el bregma, se localizaron las coordenadas correspondientes a la región del EDM: anteroposterior AP=+0.4 mm., mediolateral (ML)= ± 2.6 mm. y dorsoventral (DV)= -4 mm conforme al atlas del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2005). Se realizaron dos orificios paralelos con ayuda de un taladro de uso fino para la implantación de las cánulas guías (fabricadas de tubo de acero inoxidable del no. 23) de 11 mm. Además se colocó un tornillo para asegurar la fijación las cánulas al cráneo con cemento dental; A cada cánula se le

coloco un tapón de 11mm para impedir la obstrucción. Las ratas se recuperaron después de la cirugía en una incubadora y recibieron 2 ml de solución salina isotónica por vía subcutánea. Posterior a la recuperación, las ratas fueron trasladadas al bioterio del laboratorio de la Unidad de Análisis de la Conducta con la finalidad de continuar la recuperación, y que las ratas se habituaran al lugar antes de iniciar los procedimientos experimentales.

6.3 Manipulación.

Posterior a la cirugía, las ratas tuvieron una semana de recuperación en la cual los sujetos tuvieron tres sesiones consecutivas de manipulación (3-5 min.) con la finalidad de habituarlos a la presencia y manejo del experimentador. La manipulación consistió en remover al sujeto de su jaula habitación, colocarlo y mantenerlo libre sobre una toalla en el regazo del experimentador y acariciar suavemente a la rata, además de verificar el buen estado de las cánulas. En la última sesión de manipulación se colocaron en las cánulas inyectores guía de 12mm simulando la microinyección a la que las ratas serían sometidas después del entrenamiento.

6.4 Tarea de Reconocimiento de Objetos dependiente de lugar (ROdl)

Para la tarea de ROdl se utilizó una caja de acrílico (40x40x45 cm.) cubierta en el exterior por foami negro. Se colocaron dos claves espaciales externas a la caja, una de ellas fue una cámara de video (Sony MOD HPR-XR160) y su porta cámaras que al mismo tiempo se utilizó para grabar la exploración de las ratas, mientras el otro fue una hoja blanca con líneas verticales negras. Los objetos a explorar que se utilizaron fueron dos objetos distintos, fabricados del mismo material y de tamaño similar: un foco de luz blanca en forma de espiral (11 x 4 x 4 cm.) y un frasco de vidrio transparente (5 x 5 x 5 cm.) que fueron adheridos al suelo de la caja con un velcro cubierto este y el piso de la caja por aserrín (Fig. 11). La

prueba tuvo lugar en un cuarto sonoamortiguado, con iluminación tenue y con ruido blanco de fondo para aislarlo del ruido exterior.

Se analizó la tarea de RO post ejecución mediante la observación, conteo y registro de tiempo de exploración de cada rata en videograbación, tanto del entrenamiento como de la prueba. Dos observadores realizaron las mediciones haciendo cruzamiento de lecturas para asegurar que ambos observadores estuvieran midiendo la exploración con el mismo parámetro. Los criterios para tomar como conducta de exploración fueron que tocara al objeto con la nariz y/o la cabeza estuviera orientada al objeto a una distancia aproximada de 1 cm, excluyendo cuando roía el velcro.



Figura 12. Fotografía de la caja de ROdl

6.4.1 Habitación.

Un día antes del entrenamiento cada rata se colocó en la caja de ROdl sin ningún objeto, se le permitió explorar libremente durante tres minutos con el objetivo de que se familiarizara con el contexto y disminuir el estrés provocado por un contexto novedoso.

6.4.2 Entrenamiento y prueba de ROdl.

Al día siguiente de la habituación se llevó a cabo el entrenamiento; Cada rata fue colocada en la caja en el lado opuesto de los objetos dando la cara hacia la pared de la caja. Se le permitió a la rata explorar dos objetos distintos colocados de manera paralela, separados por una distancia de 19 cm. (Objeto Familiar 1 y Objeto Familiar 2) durante 10 min. (Fig. 12.) Inmediatamente después se retiraron de la caja y en una habitación continua fueron microinyectadas como se explicará en las secciones 6.5 y 6.6.

La prueba se realizó 24 h. después del entrenamiento. Consistió en colocar en la caja experimental al sujeto con uno de los objetos presentado en la fase de adquisición en la misma posición (Objeto Familiar 1) y el otro en distinta posición (objeto en posición Novedosa) durante 3 min.

Tanto en la habituación, el entrenamiento y en la prueba se retiraron las heces, el aserrín sucio, se roció con ácido acético al 3% y se limpiaron los objetos con el etanol al 70% para evitar rastros de olor entre rata y rata. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un horario matutino, entre las 8:00 am y las 2:00 pm.

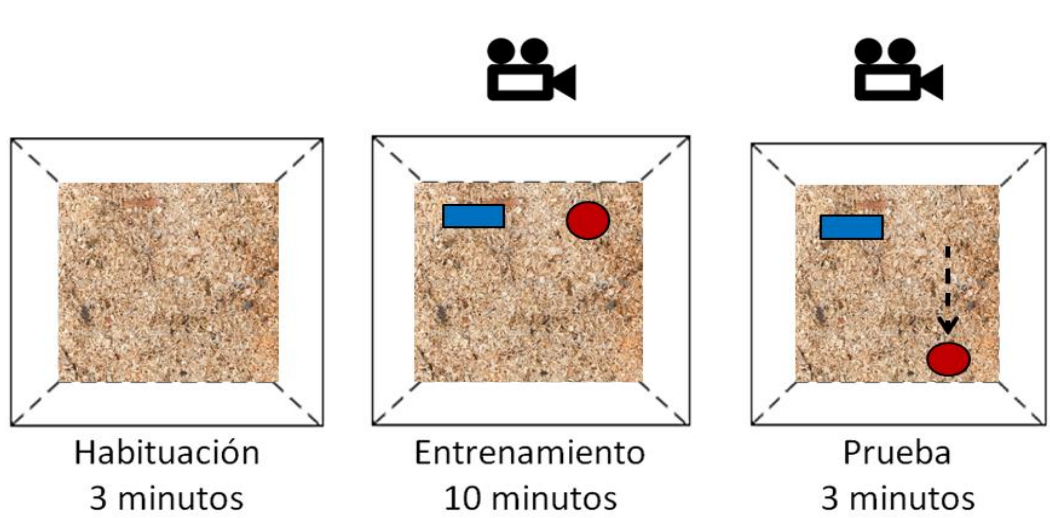


Figura 13. Representación gráfica de la tarea de ROdl. Se utilizó una caja de acrílico con dos claves espaciales externas. Los objetos a explorar fueron distintos, adheridos al suelo de la caja.

6.5 Grupos y tratamiento.

Aleatoriamente se formaron cuatro grupos independientes de ratas con una n= 10 cada uno. Los tratamientos que recibieron los grupos fueron: vehículo (VEH), o tres dosis de ANA de 0.25, 0.5 o 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las dosis de ANA se eligieron con base en estudios previos que han demostrado tener efectos sobre la consolidación de la memoria en distintas tareas (Rueda-Orozco et al., 2007)

6.6 Fármaco y microinyección.

El fármaco que se utilizó fue Araquidonletanolamida (ANA) obtenido de Sigma Aldrich. El vehículo del fármaco se preparó en una solución de 5% de polietilenglicol, 5% de Tween 80 y solución salina isotónica. Las diferentes dosis se disolvieron en el vehículo y todos los tratamientos se prepararon en un sonicador (Biansonic, MOD 2510R-MTH) durante una hora debido a su poca solubilidad. Se prepararon en fresco antes de la administración de los fármacos. La administración de ANA se realizó inmediatamente después del entrenamiento. Para ello se utilizó una bomba de infusión lenta (WPI modelo sp200i) en la cual se colocaron adecuadamente jeringas Hamilton de 10 μL conectadas por un tubo de polietileno calibre PE-20 a inyectores de 12 mm de longitud (fabricado con tubo de acero inoxidable de calibre 30) que bilateralmente administró en la región del EDM un volumen de 0.5 μL a una velocidad de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. El inyector se retiró un minuto después para una correcta difusión del fármaco.

6.7 Histología.

Una vez terminados los experimentos conductuales, las ratas se sacrificaron con la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg i.p.) y se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 4%. Se extrajeron cerebros y se mantuvieron en formaldehído al 4% durante 7 días. Posteriormente en un criostato (Leica CM1850) se realizaron

cortes coronales de 50µm de grosor a una temperatura de -21 °C, se colocaron en portaobjetos gelatinizados, se tiñeron con la técnica de Nissil y fueron observados en un microscopio estereoscópico para verificar que la posición de las puntas de las cánulas fuera correcta.

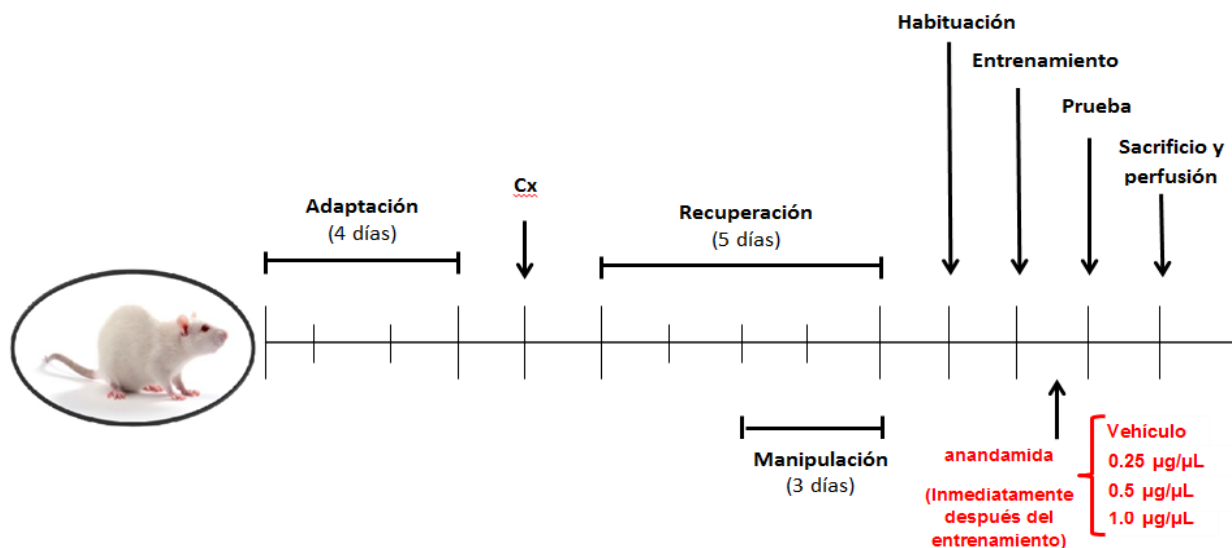


Figura 14. Protocolo experimental. Se formaron cuatro grupos independientes: un vehículo y tres grupos experimentales administrados inmediatamente después del entrenamiento.

6.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del análisis de videos en la exploración de objetos están expresados como medias \pm error estándar. Se utilizó una prueba de ANOVA de una vía para evaluar las diferencias entre los grupos. Las diferencias estadísticas entre dos condiciones fueron determinadas mediante el uso de la prueba t- de Student, tomando el valor de $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

7. RESULTADOS.

7.1 Verificación histológica

El análisis histológico tuvo como finalidad verificar la localización de las puntas de las cánulas. En el análisis estadístico se consideraron solo los datos de las ratas en la que se acertó bilateralmente la punta de la cánula en la región del EDM:

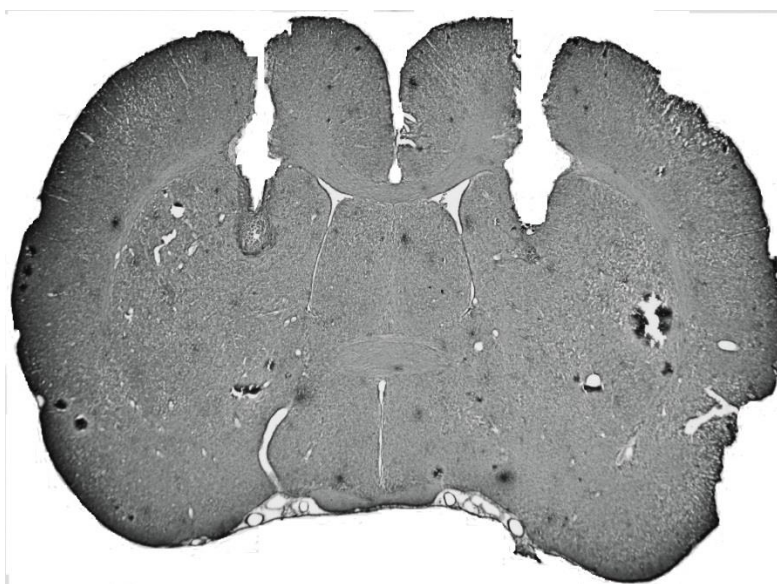


Figura 15. Fotografía de un corte coronal del cerebro de rata en el que se muestra el trazo de las cánulas bilaterales que se implantaron en el estriado dorsomedial teñido con la técnica de Nissl. Fotografía tomada con un estereoscopio marca Leica MZ95 con 1.5 aumentos, acoplados a un sistema computarizado con el software Zoon Brower EX

La ubicación de las puntas de las cánulas de todos los sujetos incluidos en el análisis estadístico obtenido del análisis histológico se muestra en la Fig. 15. Los diagramas muestran cortes coronales correspondientes a las coordenadas del estriado dorsomedial tomados del atlas Paxinos y Watson (2005). Las coordenadas del EDM respecto a bregma fueron: antero-posterior, +0.4 mm.; mediolateral, \pm 2.6 mm. y dorsoventral, -4.0 mm.

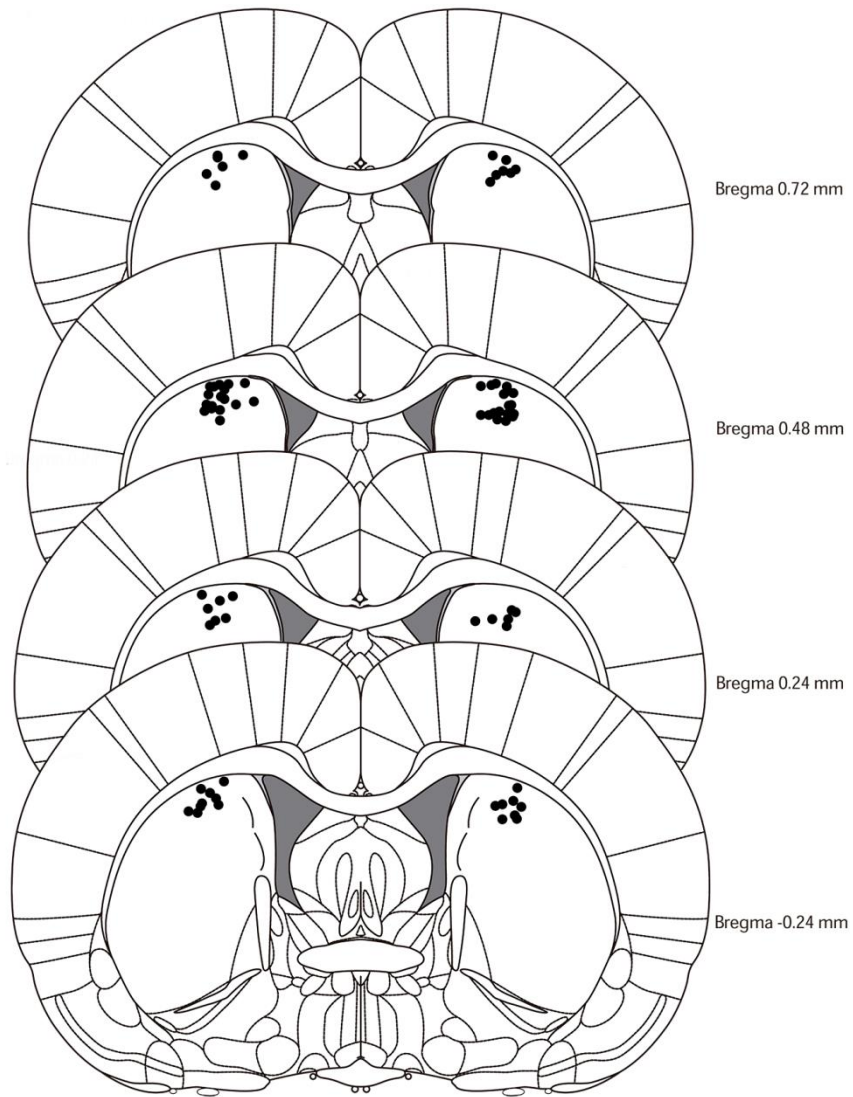


Figura 16. Diagramas de cortes coronales del cerebro de rata que muestra la ubicación de las puntas de las cánulas en la región del EDM

Para el análisis estadístico se incluyeron solo los datos de las ratas que no presentaron problemas durante la cirugía, que tuvieron un óptimo implante quirúrgico, una administración correcta de los tratamientos y que contaron con las puntas de las cánulas en la región adecuada.

7.2 Resultados estadísticos.

Entrenamiento en la tarea de ROdl

El tiempo de exploración a los objetos fue la variable que se tomó en cuenta para evaluar los efectos de los distintos tratamientos sobre la memoria. En el entrenamiento de la tarea de ROdl el tiempo de exploración en ambos objetos pasaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov por lo tanto tienen una distribución normal. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía (tratamientos) y no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 15).

Se analizó el tiempo que las ratas exploraron el objeto familiar 1 y el objeto familiar 2 por grupo mediante una prueba de T de Student y no se encontraron diferencias significativas. Esto significa que las ratas no tuvieron una preferencia por explorar un objeto en particular, exploraron en la misma proporción ambos objetos. Además, las ratas aún no habían recibido la administración de los tratamientos.

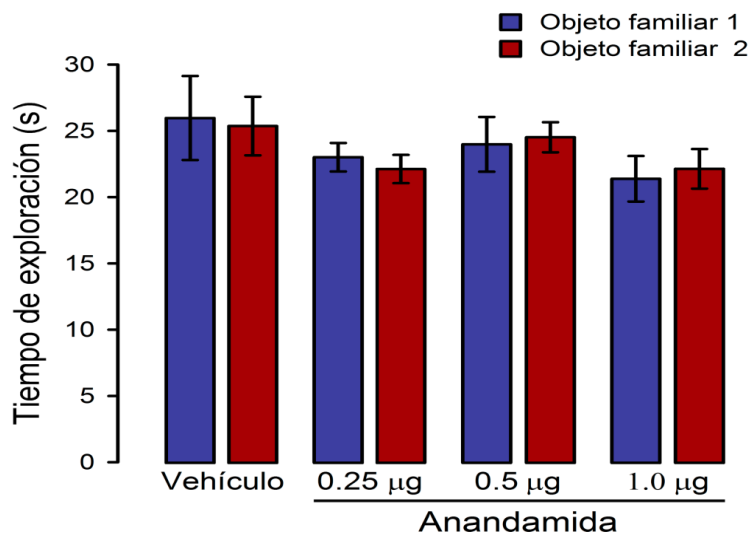


Figura 17. Entrenamiento. Se muestra la media \pm el error estándar del tiempo de exploración para los objetos familiar uno y objeto familiar dos durante el entrenamiento. No hubo diferencias significativas en el tiempo de exploración entre el objeto familiar uno y el objeto familiar dos. Veh (n=10), ANA 0.25 (n=10), ANA 0.5 (n=10), ANA 1.0 (n=10).

Prueba en la tarea de ROdl

En la prueba de la tarea de ROdl los datos obtenidos del tiempo de exploración presentaron una distribución normal por Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía (tratamiento) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, en conjunto, el análisis indica que no hubo un efecto de los tratamientos sobre el tiempo de exploración en el objeto familiar en comparación con el objeto en posición novedosa. El análisis estadístico por tratamiento se realizó mediante una prueba de T de Student.

El grupo que recibió vehículo tuvo un tiempo de exploración significativamente mayor en el objeto en posición novedosa con respecto al objeto familiar ($t=2.916$, $P= 0.053$); por consiguiente podemos inferir que recordó que uno de los objetos cambió de posición y lo exploró en mayor cantidad. El grupo que recibió la dosis de $0.25 \mu\text{g}$ de ANA también exploró por más tiempo el objeto en posición novedosa en comparación con el objeto familiar ($t=3.571$; $P=0.006$); estos datos sugieren que las ratas recordaron la ubicación anterior de objeto y lo exploró en mayor cantidad en su nueva ubicación.

Sin embargo, los grupos que recibieron las dosis más altas de ANA, 0.5 y 1.0 de ANA no presentaron una exploración diferente entre el objeto en posición novedosa en comparación con el objeto familiar ($t= 1.496$, $P=0.8758$; $t=1.805$, $P=0.1814$ respectivamente). Estos resultados sugieren que estos tratamientos tienen una interferencia con el recuerdo en el reconocimiento de la ubicación de los objetos.

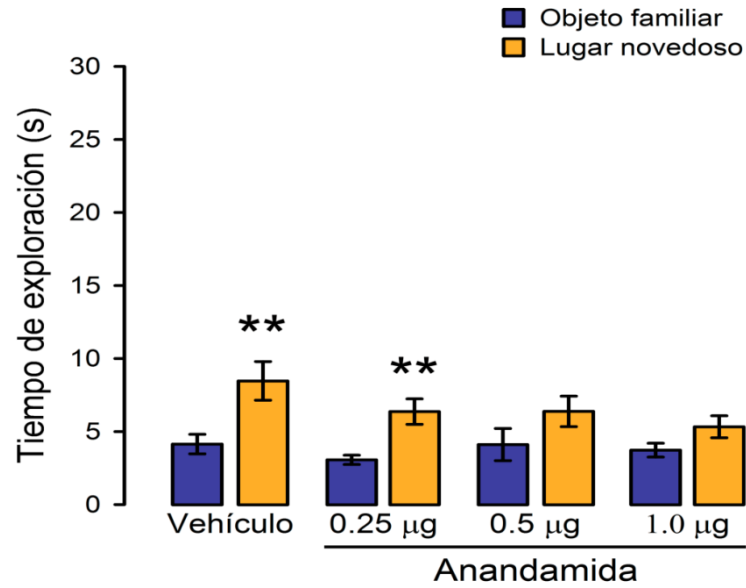


Figura 18. Prueba. Se muestra la media \pm el error estándar del tiempo de exploración para el objeto familiar y el objeto en posición novedosa durante la prueba. Hubo diferencias significativas en el tiempo de exploración entre el objeto familiar y el objeto en lugar novedoso en el grupo que recibió la dosis más baja (0.25 μ g); mientras los grupos de dosis más altas (0.5 μ g y 1.0 μ g) solamente fue diferente al grupo vehículo. (**) ($P < 0.01$)

8. DISCUSION

En este trabajo se evaluó el efecto de la activación de los receptores a endocannabinoides con el agonista ANA en la región del EDM sobre la consolidación de la memoria en la tarea de ROdl. Se encontró en este estudio que la administración de ANA inmediatamente después del entrenamiento no facilita la consolidación de la memoria. No hubo diferencias significativas durante la prueba de la tarea entre el grupo vehículo y el grupo que recibió la dosis baja de anandamida (0.25 µg) mientras los grupos que recibieron las dosis altas de anandamida (0.5 o 1.0 µg) no presentaron reconocimiento de objeto en posición novedosa.

En este trabajo estudiamos la región del EDM porque expresa una gran densidad del receptor a cannabinoides CB1 como se ha descrito anteriormente, también porque tratamos de esclarecer la participación del sistema cannabínérgico estriatal en el aprendizaje y la memoria espacial, que no ha sido tan ampliamente estudiado como el hipocampo.

Los resultados en este proyecto indican que el agonista cannabinoide ANA no facilita la consolidación de la memoria como se propuso en un inicio. Contrario a esto, investigaciones previas postulan que alterando el sistema cannabínérgico se afecta formación de la memoria. Esto sugiere que la liberación endógena de cannabinoides que se produce durante un estímulo-respuesta / hábito experiencia de aprendizaje puede ser óptima para la memoria, mientras que la interrupción del sistema cannabínérgico endógeno puede reducir la formación de la memoria de respuesta. (Goodman & Packard, 2014)

Asimismo es importante destacar que la modulación de la memoria espacial en el EDM se debe a la conectividad de esta a región con el hipocampo a través de fibras de la fimbria-fornix. (Voorn et al., 2004). Actualmente se sabe que la actividad del hipocampo está relacionada con la memoria espacial pero aún se

desconocen detalladamente los mecanismos neurofisiológicos mediante los cuales el estriado y el hipocampo compiten o cooperan durante el aprendizaje y a su vez porque ruta los cannabinoides provocan todas las respuestas conductuales que tienen que ver con su interacción con otras estructuras y sobre todo otros sistemas de neurotransmisión.

Rueda-Orozco et al. (2008) realizaron un trabajo en el cual administraron ANA en el estriado y el hipocampo en dosis de 0.5 µg, 1 µg y 2 µg inmediatamente después del entrenamiento; se observó que afecta la consolidación en ratas entrenadas en el laberinto de Barnes; mostraron además que no hubo efecto del tratamiento en el tiempo de ejecución o total de errores durante la fase de luz. En esta investigación, las ratas del grupo control mostraron una preferencia significativa por la estrategia espacial en la fase de luz del ciclo. Al administrar 1 µg y 2 µg de ANA en el hipocampo, se observó una disminución significativa de la estrategia espacial en la fase de luz, y un aumento en la estrategia serial respecto a control. Esto sugiere que agonistas cannabinoides pueden afectar la memoria por medio de la disminución del aprendizaje de procedimiento.

Al igual que en el hipocampo, la activación del CB1 en el estriado disminuye la liberación de GABA. Wallmichrath & Szabo (2002) mostraron que las proyecciones GABAérgicas originadas en el núcleo caudado putamen que llegan a la sustancia negra, son moduladas mediante el CB1 que se expresa presinápticamente. El efecto de la activación del CB1, resulta en la disminución de las corrientes inhibitoras en las células dopaminérgicas nigroestriatales.

En 2005 se demostró que la liberación de GABA era modulada a la baja en presencia de agonistas cannabinérgicos y este efecto era bloqueado mediante los antagonistas cannabinérgicos SR141716A y AM251 (Kofalvi et al., 2005). Posteriormente a este estudio, Narushima, Hashimoto & Kano, (2006) demostraron que al igual que en el hipocampo, el sistema cannabinérgico está implicado en la supresión de la inhibición inducida por la despolarización (DSI) que

ocurre en las interneuronas de disparo rápido que están inervando a las neuronas espinosas medianas. Recalcando que la DSI es la activación de los receptores CB1 que disminuye transitoriamente la inhibición de ciertos neurotransmisores. La administración del SR141716A bloqueó completamente la inducción de la DSI y la administración de WIN 55,212-2 asemejó los efectos de la despolarización necesaria para producir DSI.

En otro estudio, Kreitzer y Malenka (2007) en registros de células que forman la vía directa e indirecta de comunicación de los ganglios basales lograron demostrar que las neuronas espinosas medianas de la vía indirecta son muy susceptibles a presentar LTD mediada por endocannabinoides. Se relaciona la activación de los receptores dopaminérgicos D2 con la ausencia de LTD. La LTD es un tipo de plasticidad sináptica que puede evocarse en el estriado.

Se ha mostrado que el sistema cannabinérgico es indispensable para la inducción de LTD en el estriado. Ronesi & Lovinger (2005) han demostrado que en ratones mutantes sin CB1, es imposible producir LTD. De igual forma se mostró que la administración de agonistas cannabinérgicos producía LTD en los ratones normales mientras que en los mutantes no. Esta inducción de LTD en ratones normales era inhibida en presencia del antagonista del CB1, el SR141716A. Concluyeron que los cannabinoides deben liberarse postsinápticamente, viajar hasta la presinápsis y allí activar al CB1 en terminales glutamatérgicas provenientes de la corteza para producir LTD.

Ahora bien, otro neurotransmisor fundamental para el funcionamiento del estriado es el glutamato. Al parecer la influencia de la neurotransmisión glutamatérgica es generar potencialización a largo plazo (LTP), implicándose sobre todo en procesos de memoria espacial. Se cree que los cannabinoides inhibirían la liberación de glutamato a nivel presináptico, no pudiendo activar los receptores para glutamato NMDA y AMPA (Sullivan, 2000). El CB1 se encuentra

altamente expresado a nivel presináptico, así como en núcleo estriado y su papel ahí es el de modular la liberación de GABA y glutamato.

El déficit cognitivo provocado por los cannabinoides podría implicar también al sistema dopaminérgico, pues se vio que tanto en el deterioro de la memoria como en la inhibición colinérgica del hipocampo había una clara y doble influencia de los receptores D2 y CB1. Se ha visto que el SR141716A puede aumentar los niveles de acetilcolina en el hipocampo y facilitar la memoria (Terranova et al., 1996).

Uno de los efectos de los cannabinoides más claramente descritos es el deterioro en los procesos de aprendizaje y memoria, pero también existen hipótesis que hablan del probable papel en la formación de la memoria, mediante la consolidación de la memoria (Campolongo et al., 2009; Morena & Campolongo, 2014)

Como ya se había citado anteriormente, Morena y Campolongo (2014) han demostrado en la tarea de evitación inhibitoria que un choque eléctrico fuerte (0.45 mA) produce un aumento de ANA en zonas relacionadas con la memoria y aprendizaje en comparación con grupos control. En este mismo trabajo, se administró después del entrenamiento el inhibidor de la FAAH, URB597, y posteriormente un antagonista al receptor CB1, AM251, en el hipocampo. Se encontró que el inhibidor URB597 aumenta los niveles de ANA y la activación de receptores CB1, mejorando la consolidación de la memoria; mientras que cuando se bloquea el receptor con el antagonista AM251, perjudica la consolidación de experiencias aversivas. Postulando que la liberación endógena del endocannabinoide ANA mejora la consolidación de la memoria y esa mejora de la memoria depende de las interacciones funcionales entre diferentes regiones del cerebro.

Esto último también apoya al estudio publicado por Lucas De Oliveira y et al. (2008), en cual infunden en ratas *Wistar* un antagonista selectivo de los receptores

CB1, AM251 y un agonista endógeno, ANA antes e inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. Los resultados de la administración de los fármacos en hipocampo dorsal mostraron que no influyen en la adquisición de la tarea. Por el contrario, la administración del agonista ANA mejora la consolidación de la memoria. Demostrando que la consolidación de la memoria depende de la integridad del sistema endocannabinérgico. Estos resultados al igual que los presentados en este proyecto muestran una falta efectividad en dosis altas de ANA, ya que no facilitan, ni deterioran la memoria, solo la neutralizan. Esto puede ser explicado por su unión de la ANA a otros sitios como a receptores muscarínicos (Christopoulos & Wilson, 2001) o receptores TRPV1 vainilloides (Di Marzo, Bisogno, & De Petrocellis, 2001; Ross et al., 2001). Por otro lado el efecto de la ANA es difícil de interpretar aún en dosis muy bajas pero se especula que la facilitación o mantenimiento de la memoria por la ANA en dosis bajas puede ser porque es dirigido específicamente a los receptores CB1, contrario a la posible activación de diferentes receptores en dosis altas de ANA.

Hasta el momento no existen evidencias claras en la participación del sistema cannabinérgico estriatal en los procesos cognitivos. Sin embargo todo indica hasta ahora con los diferentes experimentos realizados que el sistema cannabinérgico en el núcleo estriado juega un papel fundamental y muy fino en un tipo específico de plasticidad conocido como LTD. En este sentido, la literatura reporta el sinérgico rol de los cannabinoles tanto inhibiendo la excitación como de la propia inhibición en los diferentes sistemas de neurotransmisión, así como la activación o modulación de las distintas estructuras implicadas en el proceso de consolidación de la memoria. Se debe recordar que la interacción del sistema endocannabinérgico en el aprendizaje y la memoria de reconocimiento espacial pueden involucrar otras estructuras además del hipocampo y el estriado, en este caso dorsomedial. Es por ello que no se da por descartado la hipótesis del rol del sistema cannabinérgico en la facilitación de la consolidación de la memoria aunque a nivel conductual son escasos los trabajos que intentan esclarecer la participación del sistema cannabinérgico en el EDM.

Finalmente una cuestión esencial para el estudio de los sistemas múltiples de una memoria es esclarecer como cooperan o compiten los sistemas durante la adquisición y consolidación de la memoria de reconocimiento espacial y a su vez cómo se codifica, almacena la información en cada región. Es por ello la importancia de los métodos de lesión y farmacología conductual para ubicar las regiones del cerebro que tienen participación en procesos de memoria, fundamentales para mostrar la cooperación y competencia sin olvidar los mecanismos neurofisiológicos involucrados en el procesamiento de la información que permitan la codificación de las representaciones espaciales.

10. CONCLUSIÓN.

El presente trabajo encontró que en la administración de distintas dosis de ANA en la región del EDM no facilitan la consolidación de la memoria en la tarea de ROdl. Por el contrario, las administraciones de dosis altas de ANA (0.5 o 1.0 µg) no producen reconocimiento de objeto en posición novedosa en la consolidación de la memoria. Concluyendo con esto que los endocannabinoides modulan la codificación y consolidación de la memoria de reconocimiento de lugar no solo en el hipocampo sino también la región del EDM.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58(4), 315-348.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., & Bermudez-Rattoni, F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 213-222.
- Bisogno, T., Ligresti, A., & Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 81(2), 224-238.
- Bouaboula, M., Bourrie, B., Rinaldi-Carmona, M., Shire, D., Le Fur, G., & Casellas, P. (1995). Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13973-13980.
- Brown, M. W., & Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature reviews. Neuroscience*, 2(1), 51-61.
- Campolongo, P., Morena, M., Scaccianoce, S., Trezza, V., Chiarotti, F., Schelling, G., . . . Roozendaal, B. (2013). Novelty-induced emotional arousal modulates cannabinoid effects on recognition memory and adrenocortical activity. *Neuropsychopharmacology*, 38(7), 1276-1286.
- Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Hauer, D., Schelling, G., McGaugh, J. L., & Cuomo, V. (2009). Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4888-4893.
- Christopoulos, A., & Wilson, K. (2001). Interaction of anandamide with the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Research*, 915(1), 70-78.
- De Oliveira, L., Pasqualini, B., Diehl, F., & Quillfeldt, J. A., (2008). Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation

- and retrieval mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2008), 1-9
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J. B., Finazzi-Agró, A., & Di Marzo, V., (2001). The activity of anandamide at Vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 12856-12863
- Devan, B. D., & White, N. M. (1999). Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *The Journal of neuroscience*, 19(7), 2789-279
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., . . . Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258(5090), 1946-1949.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51-86.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47-59.
- Featherstone, R. E., & McDonald, R. J. (2005). Lesions of the dorsolateral or dorsomedial striatum impair performance of a previously acquired simple discrimination task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 159-167.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., . . . Mitchell, R. L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Molecular Pharmacology*, 48(3), 443-450.
- Felder, C. C., Nielsen, A., Briley, E. M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., . . . Becker, G. W. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Letters*, 393(2-3), 231-235.

- Gerard, C. M., Mollereau, C., Vassart, G., & Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *The Biochemical Journal*, 279 (Pt 1), 129-134.
- Goodman, J., & Packard, M. G., (2014). Peripheral and intra-dorsolateral striatum injections of the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212-2 impair consolidation of stimulus-response memory. *Neuroscience*, 272, 128-137
- Gurney, K., Prescott, T. J., Wickens, J. R., & Redgrave, P. (2004). Computational models of the basal ganglia: from robots to membranes. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 453-459.
- Harris, L. S., Carchman, R. A., & Martin, B. R. (1978). Evidence for the existence of specific cannabinoid binding sites. *Life Sciences*, 22(13-15), 1131-1137.
- Kofalvi, A., Rodrigues, R. J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E. S., Cunha, R. A., & Sperlagh, B. (2005). Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *The Journal of Neuroscience* 25(11), 2874-2884.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543-554.
- Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., & Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *The Journal of Neuroscience* 15(10), 6552-6561.
- Martinez-Vargas, M., Murillo-Rodriguez, E., Gonzalez-Rivera, R., Landa, A., Mendez-Diaz, M., Prothro-Garcia, O., & Navarro, L. (2003). Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience*, 117(1), 197-201.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.

- McKinney, M. K., & Cravatt, B. F. (2005). Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 411-432.
- Mechoulam, R. (2002). Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 66(2-3), 93-99
- Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 445-468.
- Morena, M., & Campolongo, P. (2014). The endocannabinoid system: an emotional buffer in the modulation of memory function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 112, 30-43.
- Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65.
- Narushima, M., Hashimoto, K., & Kano, M. (2006). Endocannabinoid-mediated short-term suppression of excitatory synaptic transmission to medium spiny neurons in the striatum. *Neuroscience Research*, 54(3), 159-164.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. (2001) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (pp.65). México:SENASICA
- Olah, Z., Karai, L., & Iadarola, M. J. (2001). Anandamide activates vanilloid receptor 1 (VR1) at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31163-31170.
- Onaivi, E. S. (2006). Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*, 54(4), 231-246.
- Packard, M. G., Hirsh, R., & White, N. M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *The Journal of Neuroscience*, 9(5), 1465-1472.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(11), 873-884.

- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Prather, P. L., Martin, N. A., Breivogel, C. S., & Childers, S. R. (2000). Activation of cannabinoid receptors in rat brain by WIN 55212-2 produces coupling to multiple G protein alpha-subunits with different potencies. *Molecular Pharmacology*, 57(5), 1000-1010.
- Romero, J., Garcia, L., Fernandez-Ruiz, J. J., Cebeira, M., & Ramos, J. A. (1995). Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 51(4), 731-737.
- Ronesi, J., & Lovinger, D. M. (2005). Induction of striatal long-term synaptic depression by moderate frequency activation of cortical afferents in rat. *The Journal of Physiology*, 562(Pt 1), 245-256. doi: 10.1113/jphysiol.2004.068460
- Ross, Ruth A., Coutts, Angela A., McFarlane, Shona M., Anavi-Goffer, Sharon, Irving, Andrew J., Pertwee, Roger G., . . . Scott, Roderick H. (2001). Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*, 40(2), 221-232.
- Rueda-Orozco, P. E., Soria-Gomez, E., Montes-Rodriguez, C. J., Martinez-Vargas, M., Galicia, O., Navarro, L., & Prospero-Garcia, O. (2007). A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*, 198(4), 565-576.
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Ischemic brain damage and memory impairment: a commentary. *Hippocampus*, 6(5), 546-552.
- Squire, L. R., (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(2004), 171-177
- Squire, R. L., & Zola-Morgan, J. (1991). The cognitive neuroscience of human memory since H. M. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 259-288
- Sugiura, T., Kodaka, T., Nakane, S., Miyashita, T., Kondo, S., Suhara, Y., . . . Ishima, Y. (1999). Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-

- arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2794-2801.
- Sullivan, J. M. (2000). Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learning & Memory*, 7(3), 132-139.
- Terranova, J. P., Storme, J. J., Lafon, N., Perio, A., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., & Soubrie, P. (1996). Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology* 126(2), 165-172.
- Tepper, J. M., & Plenz, D. (2008). Microcircuits in the striatum striatal cell types and their interaction. En S. Grilner & M. A. Graybiel (eds.), *Microcircuits: The interface between neurons and global brain function*. Pp. 105-126) Cambridge, MA: MIT Press.
- Thompson, R. F., & Kim, J. J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13438-13444.
- Varvel, S. A., & Lichtman, A. H. (2002). Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 915-924.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2(7), 489-501.
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. (2004). Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 468-474.
- Wallmichrath, I., & Szabo, B. (2002). Cannabinoids inhibit striatonigral GABAergic neurotransmission in the mouse. *Neuroscience*, 113(3), 671-682.
- Whishaw, I. Q., Mittleman, G., Bunch, S. T., & Dunnett, S. B. (1987). Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats. *Behavioural Brain Research*, 24(2), 125-138.

White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 125-184.

ABREVIATURAS

- AC.** Adenilato Ciclasa
- ACh.** Acetilcolina
- AMPC.** Adenosin Monofosfato cíclico
- ANA.** Anandamida-Araquidoniletanolamida
- CB1.** Receptor a cannabinoide tipo 1
- CB2.** Receptor a cannabinoide tipo 2
- DSI.** Supresión de la inhibición inducida por la despolarización
- EDL.** Estriado Dorsolateral
- EDM.** Estriado Dorsomedial
- FAAs.** Ácidos grasos amidados
- FAAH.** Hidrolasa de ácidos Grasos Amidados.
- GABA.** Ácido γ -aminobutírico
- GB.** Ganglios basales
- GPI.** Globo pálido interno
- GPe.** Globo pálido externo
- LTD.** Depresión a largo plazo (Long-term depression)
- LTP.** Potencialización a largo plazo (Long-term potentiation)
- MCP.** Memoria de corto plazo
- MLP.** Memoria de largo plazo
- 2-AG.** 2-Araquidonilglicerol
- NST.** Núcleos subtalamicos
- SNr.** Sustancia negra pars reticulata
- SNc.** Sustancia negra pars compacta
- NMDA.** Receptor de glutamato N-metil-D-aspartato
- ONSc.** Óxido Nítrico Sintetasa constitutiva
- RO.** Reconocimiento de objetos.
- ROdl.** Reconocimiento de objeto dependiente de lugar.
- SNC.** Sistema Nervioso Central
- TAM.** Transportador de membrana de anandamida
- THC.** Tetrahidrocannabinol