



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Participación de receptores muscarínicos post-
sinápticos en la región de CA3 del hipocampo
durante la adquisición y/o consolidación de una
memoria espacial**

BARBARA PAMELA SERRANO FLORES

DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. Wendy Verónica Herrera Morales



FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

<p>1. Datos del alumno Serrano Flores Barbara Pamela 56187141 Universidad nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 099303088</p>
<p>2. Datos del tutor M. en C. Wendy Verónica Herrera Morales</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Biól. Luis Núñez Jaramillo</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 M. en IBB. Alette Ortega Gómez</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Psic. Mónica Andrea Herrera Solís</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 IBQ Héctor Quezada Pablo</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Participación de los receptores muscarinicos post-sinápticos de hipocampo en la región CA3 durante la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial 62p 2007</p>

Dedicatoria

Dedico esta tesis:

A mis padres; por la dedicación, disciplina y amor con que me educaron.

A mis hermanas; por su nobleza, amistad y cuidados.

A Miguel; por su gigantesca entereza, confianza y cariño.

A Ivonne y Silvia; por su enorme corazón, amistad y paciencia.

A mis amigos; por que en las batallas lo que nos hace crecer son las derrotas no las victorias.

Agradecimientos

Gracias a mis padres por su amor y apoyo incondicional, por enseñarme a ser una persona íntegra, tenaz, comprometida, y con metas por las cuales luchar. Por darme bases en donde la mediocridad y la deshonestidad esta fuera de lugar. A mis hermanas, a mi Bicho y a Paola, gracias por su confianza pero sobre todo por lo que hemos compartido y crecido juntas, gracias por siempre estar ahí.

A mi familia por darme el privilegio de haber sido educada por abuelitas, abuelitos, tíos y tías; por que siempre han estado pendientes de mi y me han apoyado pero también regañado gracias por que sin ustedes yo no sería el ser humano que soy.

A Miguel, sin su incondicional paciencia, comprensión, apoyo y cariño llegar a este momento hubiese sido más difícil. Gracias por recordarme siempre que lo importante es hacer las cosas con el corazón.

A Silvia e Ivonne, gracias por su sincera amistad y cariño por que han festejado conmigo y llorado también. Por celebrar conmigo los momentos de gloria y por alentarme en los de angustia. Por que un verdadero amigo no es el que siempre te apoya es el que sabe confrontar a su amigo cuando algo no esta bien.

Mi gratitud a la M. en C. Wendy Verónica Herrera Morales y el Biól. Luis Nuñez por haber depositado su confianza en mí y apoyarme durante la realización de este trabajo. Y por brindarme su amistad y consejos, pero sobre todo por enseñarme que el crecer como profesionista no deja de lado el crecimiento humano.

A mis amigos Liz, Marco, Arturo y Ricardo por que desde hace años hemos estado juntos, apoyando a levantarnos tras las derrotas y festejando nuestros aciertos. A Gaby, Mariana, Dafne, Emma, Esmeralda y Anuar, y Martha por todas las experiencias que hemos compartido a lo largo de la

carrera en donde compartimos experiencias maravillosas, gracias a todos por su amistad.

Al Equipo de Buceo de la Facultad de Ciencias EBC, gracias por enseñarme que el trabajo en equipo no es sinónimo de trabajo fácil es el resultado del esfuerzo, tenacidad y disciplina de distintas personas, en donde la tolerancia y la pluralidad son la clave del éxito.

A los profesores que me enseñaron a comprender y admirar la biología durante mi paso por la carrera.

Droit au but

Gratis et amore ab immo pectore

Never look back just learn and keep walking

Indice

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	2
I. Introducción.....	3
1.- Aprendizaje y Memoria.....	3
1.2.- Memoria Espacial.....	5
1.3.- Consolidación.....	7
2.- Hipocampo.....	9
2.1.- Almacenamiento de la Información.....	10
3.- Sinopsis, Neurotransmisión y Neurotransmisores.....	12
3.1.- Acetilcolina y Memoria Espacial.....	13
3.1.1.- Receptores Muscarínicos.....	15
3.1.2.- Receptores Muscarínicos subtipo M1 y M3.....	16
3.2.- Proteínas de la Vesícula Sináptica.....	16
3.2.1.- Sinaptofisina, proteína abundante de membrana de VS's.....	17
II. Antecedentes.....	19
2.1.- Planteamiento del problema.....	23
III. Hipótesis.....	24
IV. Objetivos.....	24
4.1.- Objetivo general.....	24
4.2.- Objetivos particulares.....	24
V. Material y Método.....	25
5.1.- Sujetos.....	25
5.2.- Cirugía.....	26
5.3.- Procedimiento Conductual.....	26
5.4.- Microinyección y Fármacos.....	27
5.5.- Procedimientos Histológicos.....	28
5.6.- Homogenización.....	29
5.7.- Cuantificación de Proteínas.....	29
5.8.- Western Blot.....	30
5.9.- Análisis de Imágenes.....	31
5.10.- Análisis de membranas.....	31

5.11.- Estadística.....	31
VI. Resultados.....	33
6.1.- Cortes Histológicos de Hipocampo.....	33
6.2.- Efecto de los antagonistas específicos de los receptores muscarínicos post-sinápticos M1 y M3 en la adquisición de una tarea espacial.....	33
6.3.- Efecto de los antagonistas de los receptores M1 y M3 en la consolidación de una memoria espacial.....	35
6.4.- Cambio en la cantidad de Syp en el área de CA3 en ratas entrenadas y control de nado.....	37
6.5.- Análisis conductual del efecto del bloqueo de los receptores M1 durante adquisición y consolidación de una tarea espacial.....	38
6.6.- Cambio en la expresión de Syp en el área de CA3 mediante la antagonización de los receptores M1 en la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial.....	39
VII. Discusión.....	42
VIII. Conclusión.....	47
Referencias.....	48

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
ASM	Área septal medial
CA1	Cuerno de Ammon 1
CA2	Cuerno de Ammon 2
CA3	Cuerno de Ammon 3
CBA	Cerebro basal anterior
FM	Fibras Musgosas
GD	Giro Dentado
HT	Homogenado Total
I.C.V.	Intra-cerebro ventricular
LTP	Potenciación a Largo Plazo
LTD	Depresión a Largo Plazo
mAChR	Receptor muscarínico de Acetilcolina
M1	Receptor muscarínico 1
M3	Receptor muscarínico 3
MCP	Memoria a Corto Plazo
mGluR's	Receptores metabotrópicos de Glutamato
MLP	Memoria a Largo Plazo
NBM	Núcleo basal magnocelular
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
SL	Stratum Lucidum
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors
SO	Stratum oriens
Syp	Sinaptofisina
VS's	Vesículas Sinápticas

Resumen

El hipocampo es un área que ha sido identificada por su importante participación en los procesos de memoria y aprendizaje, en esta estructura, uno de los neurotransmisores más involucrados en dichos procesos es la acetilcolina. Es bien sabido que los receptores muscarínicos en hipocampo, particularmente los post-sinápticos, juegan un papel fundamental en memoria y aprendizaje, sin embargo, el papel diferencial de los subtipos de receptores muscarínicos post-sinápticos durante la adquisición y consolidación de nueva información, es poco conocido. En este trabajo se distinguió la participación de los receptores post-sinápticos M1 y M3 en la región hipocampal de CA3 durante la adquisición y consolidación de una memoria espacial, mediante el laberinto acuático de Morris. Además, se determinó la relación entre la adquisición o consolidación de una tarea espacial y la expresión de sinaptofisina (syp), como marcador de sinapsis en CA3, mediante el análisis por medio de western blot del cambio en la expresión de syp. Los resultados obtenidos muestran que el bloqueo durante el entrenamiento, de receptores post-sinápticos M1, produce un déficit significativo en la consolidación de esta memoria espacial, sin provocar ningún efecto durante la adquisición de dicha tarea; pero este efecto no se observó con el bloqueo de M3. Lo cual correlaciona con el análisis del cambio en la expresión de syp, ya que se encontró que el mismo tratamiento (bloqueo de los receptores M1 en CA3 durante el entrenamiento) produce una expresión significativamente menor en la expresión de sinaptofisina en CA3 después de la prueba de memoria a largo plazo en comparación con su control.

I. Introducción

1.- Aprendizaje y Memoria

Uno de los principales objetivos en neurociencias es el describir y entender los mecanismos neuronales involucrados en la codificación, almacenamiento y evocación de la información, es decir los procesos de memoria y aprendizaje.

El aprendizaje es el proceso por medio del cual adquirimos nuevos conocimientos acerca de los eventos del mundo, y la memoria se refiere a los procesos mediante los cuales retenemos y evocamos dichos conocimientos (Squire, 1987).

Se han propuesto diferentes clasificaciones de memoria, una de las más aceptadas consta en la división de memoria a corto plazo (MCP) y a largo plazo (MLP). Dicha clasificación fue propuesta por Hermann Ebbinghaus en 1885, la trascendencia de su trabajo cambió el escenario de las discusiones de un plano teórico como había sido hasta ese momento a la comprobación experimental; dando como resultado la curva de ahorro y olvido, (gráfica que muestra que tras haber aprendido una tarea cuando el individuo se expone de nuevo a ella, puede recordar parte de la información adquirida); dicha clasificación fue formalizada años después por William James quién propuso que la poca información que era posible recordar inmediatamente después de estudiarla, constituía una memoria primaria (MCP) y por el contrario cuando la información ya no ocupa nuestra atención y dejamos de tener una intención sobre ella, pasa a formar parte de la memoria secundaria (MLP) (James, W., 1890).

A pesar de que experimentos posteriores a los de James seguían apoyando las ideas de Ebbinghaus, era necesario encontrar algún fundamento neurológico que respaldara su clasificación y que eliminara la posibilidad de que se tratara de una sola memoria, unitaria e indivisible. Dando un respaldo

fundamental para la diferenciación de la memoria de corto plazo (información que es capaz de ser recordada inmediatamente después de adquirirla) y la memoria a largo plazo (información que puede ser recordada a voluntad, siempre y cuando no se olvide); Müller y Pilzecker en 1900 adicionan el término de consolidación, con lo que se referían a que la información recientemente adquirida es frágil y susceptible de borrarse (MCP), pero si la información se consolida puede convertirse en una memoria estable a largo plazo (MLP) (Op. Cit. en Riedel and Micheau, 1999).

Recientemente existe la idea de que los diversos fenómenos de la memoria no dependen de un único sistema, sino que dependen de diversos sistemas de memoria. El término de sistemas múltiples de memorias se refiere a la idea de que dos o más sistemas son caracterizados por reglas de operación fundamentalmente diferentes. A partir del sistema de clasificación de la memoria propuesto por Tulving (1985), un sistema de memoria se define como la interacción entre los mecanismos de codificación, almacenamiento y evocación que utilizan ciertas reglas de operación. Tulving divide la memoria en explícita (aquella que puede ser declarada) e implícita (aquella que no puede ser declarada) (Tulving, E., 1985).

A principios de los 80's solo había algunos indicios de que la memoria no era una facultad mental única. Pues la memoria no es una entidad individual sino que consiste en varias entidades separadas que dependen de diferentes sistemas cerebrales. La principal diferencia entre estos sistemas es la capacidad de recolección intencional de hechos y eventos (memoria declarativa); y la recolección heterogénea de capacidades no intencionales que son expresadas a través de la ejecución y de no disponer de un acceso al contenido de alguna memoria consciente (memoria no declarativa) (Squire and Zola, 1996). Esta clasificación de la memoria a largo plazo fue hecha por Larry Squirre, en este modelo divide a la memoria en declarativa y no declarativa. Su método de medición es el que provee las principales diferencias ya que para la memoria declarativa se utilizan pruebas explícitas (aquellas que requieren un recuerdo intencional de la información) mientras que para la memoria no declarativa se utilizan pruebas implícitas (aquellas en las que la experiencia

altera la conducta no intencionalmente sin proveer acceso a ningún contenido nemónico). Cada uno de estos sistemas se relaciona con sustratos neuronales que pueden trabajar o no de manera independiente, siendo indispensable para la formación de memorias declarativas: el hipocampo, el lóbulo temporomedial y el diéncefalo y para la formación de memorias no declarativas, las vías reflejas, cerebelo, amígdala, entre otras (Squire and Zola, 1996).

1.2.- Memoria espacial

La memoria declarativa se divide en 2 clases: memoria episódica (recolección explícita de incidentes que ocurren en un lugar y tiempo determinados) y semántica (conocimiento general de hechos y conceptos que no son ligados a ningún tiempo y lugar en particular). La memoria espacial consiste en la relación espacio temporal hecha por un organismo para ubicarse en un determinado lugar por medio de claves espaciales que le permitan hallarse en dicho espacio, es un tipo de memoria episódica y por lo tanto una memoria declarativa (Squire and Zola, 1996). Este tipo de memoria se encuentra directamente relacionada con el área cerebral subcortical denominada hipocampo; en dicha estructura se han realizado diversos experimentos y se ha observado que la lesión de esta estructura y sus conexiones produce un déficit en la orientación espacial en humanos, primates no humanos y roedores. O'Keefe y Nadel (1978) reportan la presencia de células de lugar en el hipocampo. Sus trabajos de orientación en ratas empleando registros unicelulares; muestran que la activación de estas células no depende de la orientación del animal, de la actividad que esté desarrollando en un cierto momento o de la trayectoria, sino del lugar en el que se localiza, siempre y cuando dicho lugar sea un ambiente simplificado (con pocas claves de orientación). Anatómicamente las células de lugar son neuronas piramidales de la región de CA1 y CA3 del hipocampo. Así mismo observaron que esta codificación de un lugar se establecía en pocos minutos y podía durar varias semanas. En diversos estudios se ha observado que en los animales con hipocampos bilateralmente lesionados, estas representaciones espaciales no

son tan eficientes. Por ejemplo en los trabajos de Hollup et al. (2001) realizan lesiones que causan un severo déficit en la identificación de la localización, sugiriendo que el hipocampo puede ser esencial en el reconocimiento de imágenes durante la navegación. Algunos autores han sugerido que tanto las células de lugar extrahipocampales; células de lugar fuera del hipocampo (Sharp, PE, 1997) como las células de orientación; células cuya actividad depende de la orientación del animal (Golob, et. al., 1997), son capaces de crear una representación espacial compleja del contexto en el que se mueve el animal. Con estos trabajos así como muchos otros, que incluyen trabajos en humanos y primates no humanos se ha aceptado ampliamente la implicación del hipocampo en memorias declarativas y particularmente en la memoria espacial.

Dado que la memoria espacial está clasificada dentro de la memoria declarativa, una forma de medirla es por medio de pruebas explícitas dentro de las cuales se encuentra la resolución de laberintos. Existen diferentes tipos de laberintos, por ejemplo el laberinto T, el radial de 4 y 8 brazos, el laberinto acuático de Morris, entre otros. Del mismo modo existen diversas estrategias de resolución de estos laberintos, como las estrategias simples o asociativas, basadas en la asociación de un estímulo saliente de la habitación con la posición del brazo meta, o estrategias complejas como la cartográfica en donde el organismo se vale de diferentes señales espaciales fuera del laberinto para ubicar su meta. Desde los años 40's, debido fundamentalmente a los trabajos de Tolman, se conocían diversas estrategias empleadas por los animales para orientarse en su medio y alcanzar una meta (Op. cit. en Ramos 2002). O'Keefe y Nadel mencionan que la estrategia de orientación cartográfica es dependiente del hipocampo; dicha estrategia es utilizada por los roedores en la resolución de laberintos (O'keefe and Nadel, 1978).

El laberinto acuático de Morris es una tarea conductual descrita hace 20 años, diseñada para investigar aprendizaje y memoria espacial en ratas. Este laberinto consta de un dispositivo circular con una plataforma oculta bajo el agua que evita su observación directa; obligando al organismo a ubicarla por medio de las claves espaciales externas al dispositivo y al mismo tiempo el

agua dentro del tanque evita la identificación de marcas internas hechas por el organismo, principal característica de este laberinto (Hooge et al., 2001). La memoria espacial y la ejecución de la tarea en el laberinto de Morris parecen depender de las acciones coordinadas de diferentes regiones cerebrales y sistemas de neurotransmisores funcionalmente integradas para su trabajo conjunto.

Por su relativa simplicidad esta tarea se ha utilizado en algunos experimentos sofisticados en el estudio de la neurobiología y la neurofarmacología en la memoria y el aprendizaje espacial. En el campo de la neurofarmacología ha permitido grandes avances pues el procedimiento de entrenamiento acepta la intervención farmacológica antes y después del entrenamiento sin interferir con la tarea, permitiendo así observar el efecto del fármaco en la estructura y tiempo requerido (Hooge et al., 2001).

1.3.- Consolidación

El término de consolidación acuñado por Müller y Pilzecker más tarde fue sustentado por diversos investigadores (Davis et al. 1984, Kandel, 2001); quienes observaron que la creación de una memoria estable y persistente (MLP) requiere de la expresión de genes y de la síntesis de nuevas proteínas, es decir, un proceso de consolidación. También es aceptado que los cambios estructurales en la morfología sináptica ocurren por consecuencia o en paralelo a la síntesis de proteínas; siendo dicha síntesis la base fundamental del proceso de consolidación. La posibilidad de que la memoria puede entrelazar cambios estructurales en el sistema nervioso fue propuesto por Tanzi en 1893, quién propuso que la activación repetitiva de una neurona conlleva cambios metabólicos que dan como resultado el movimiento de ésta a un estado que la acerque más a otras neuronas, por medio de la formación de uniones asociativas; las cuales son o podrían ser las bases físicas de la memoria. Esta idea concuerda con la de Cajal y Sherrington quienes propusieron que la

alteración de las conexiones entre neuronas es una explicación de cómo se mantiene una memoria (Op. Cit. en Lamprecht and LeDoux, 2004).

La formación de MLP posee diferentes fases, entre las que se encuentran la adquisición (durante la cuál el estímulo incide en sinapsis para iniciar los cambios moleculares), la consolidación (cuando las alteraciones celulares se estabilizan progresivamente por la síntesis de proteínas) y la evocación (cuando la información previamente almacenada es requerida). Las modificaciones resultantes en el circuito neuronal dan lugar a la representación neuronal de la memoria en el cerebro. Estas modificaciones en el circuito son mediadas por la actividad molecular en la sinapsis durante una ventana de tiempo específica después del aprendizaje (Lamprecht and LeDoux, 2004).

2.- Hipocampo

Como se ha mencionado anteriormente las estructuras relacionadas con las memorias declarativas son: el diencéfalo, lóbulo temporal medial y el hipocampo. Lesiones en el lóbulo temporal producen efectos severos en la consolidación de la memoria declarativa, la cual involucra asociaciones entre hechos y eventos. Estudios sobre memoria espacial en primates no humanos y en pacientes amnésicos han permitido comenzar a delimitar las estructuras cerebrales que posiblemente están involucradas en el almacenamiento y/o la formación de la memoria. La región medial del lóbulo temporal se ha propuesto como una estructura fundamental para el almacenamiento de la memoria declarativa. Dentro de la región medial del lóbulo temporal se han propuesto a la formación hipocampal (compuesta por el hipocampo, el complejo subicular y la corteza entorrinal), así como a las cortezas perirrinal y parahipocampal como estructuras involucradas en el almacenamiento de información declarativa, estas estructuras interconectadas forman parte del sistema límbico (Op. Cit. en Bermúdez-Rattoni y Prado Alcalá., 2001).

El hipocampo es una estructura cortical filogenéticamente antigua localizada en los hemisferios cerebrales bajo la neocorteza, y se divide anatómicamente en dos regiones principales: el giro dentado y los cuernos de Ammón (CA1, CA2 y CA3). Las neuronas características del giro dentado son las llamadas células granulares, en tanto que las células piramidales constituyen el tipo celular característico de los cuernos de Ammón. En la región de los cuernos de Ammón existe una subdivisión en donde la capa de células piramidales se denomina estrato piramidal, la zona apical de estas neuronas estratum lucidum (SL) y la zona basal de estas estratum oriens (SO). Las células de estas dos regiones; giro dentado y cuernos de Ammón se conectan entre sí en la siguiente forma: los axones de las células granulares del giro dentado, que se denominan en conjunto fibras musgosas, forman una proyección compacta que hace sinápsis con las células piramidales del área CA3, y a su vez estas células proyectan sus axones hacia las células piramidales del área de CA1 por el haz denominado colaterales de Schaffer. Estos dos contactos, junto con las sinápsis corteza entorrinal – giro dentado, forman el llamado circuito trisináptico del hipocampo (Amaral DG and Witter MP, 1995). (Fig. 1)

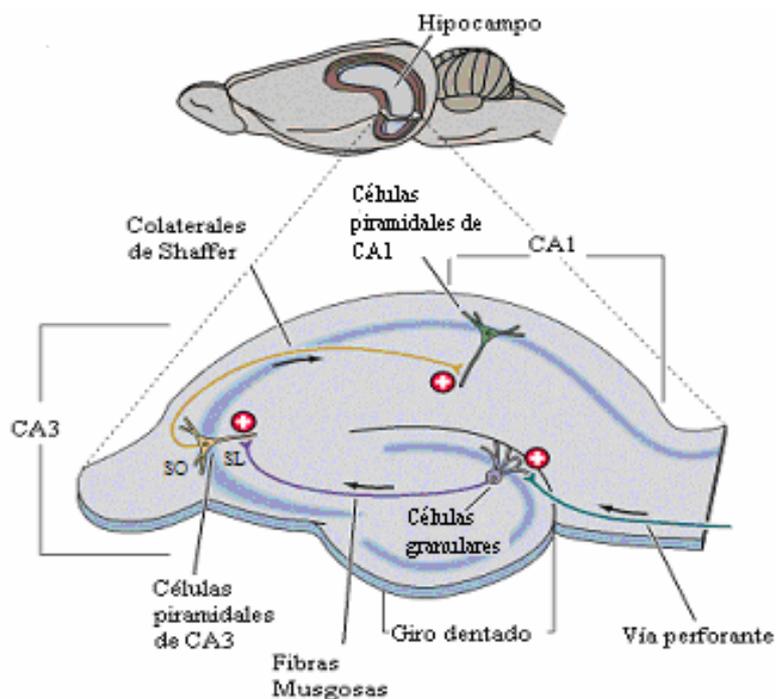


Fig. 1 Hipocampo de una rata y sus principales divisiones

2.1.- Almacenamiento de la Información

El almacenamiento de información se puede dar mediante cambios en la comunicación sináptica. Ramón y Cajal en la última década del siglo XIX propone la teoría del almacenamiento de la información, la cual postula que ésta se almacena en el cerebro por cambios anatómicos entre conexiones neuronales (Op. cit. en Bailey, et al., 2000). Donald Hebb en la década de los 40's propone la teoría de la sinapsis hebbiana, en la cual menciona que las conexiones sinápticas se fortalecen cuando existe una activación temporal coincidente (Hebb, 1949). Los eventos plásticos en el sistema nervioso central, particularmente los cambios en la función y organización de las sinapsis han sido propuestos como la base de la memoria y el aprendizaje, ya que a través de estos eventos plásticos se modifica la comunicación de las neuronas. La sinaptogénesis, es decir, la formación de nuevas sinapsis es uno de los eventos plásticos más dramáticos relacionados con la memoria y el aprendizaje. Aunque se desconoce el papel fisiológico de dichas nuevas sinapsis se piensa que su localización está relacionada con sus funciones (Ramírez-Amaya et al., 2001).

Dudai en 1989, menciona que la memoria y el aprendizaje son el resultado de los cambios en la representación neural de un estímulo y Bear en 1996 complementa esta idea mencionando que dicha representación es a través de eventos plásticos que modifican la comunicación entre las neuronas. En el hipocampo se ha observado sinaptogénesis en las fibras musgosas cuando experimentalmente se induce epilepsia (Niquet, et al., 1995). Recientemente también se ha observado que tras una estimulación de alta frecuencia que puede inducir una potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés long- term potentiation) se produce sinaptogénesis en dichas fibras (Escobar, et al.,1997). También se ha demostrado un incremento significativo en las terminales de las fibras musgosas en el área de CA3 del hipocampo específicamente en la región del stratum oriens (SO) tras el sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris a partir del tercer día de entrenamiento; a dicho aumento en las terminales de las fibras musgosas se le da el nombre de doble banda (Ramírez-Amaya et al., 1999; 2001).

3.-Sinápsis, Neurotransmisión y Neurotransmisores

El gran avance alcanzado en el conocimiento del cómo se adquiere y consolida la memoria es debido en gran parte a los estudios sobre el funcionamiento y los cambios que ocurren en la sinapsis neuronal. La sinapsis química es el sitio de comunicación entre las células nerviosas que funcionan mediante la liberación de moléculas llamadas neurotransmisores, dicho fenómeno es llamado transmisión sináptica. (Op. cit. en Bermúdez-Rattoni y Alcalá., 2001). La liberación de neurotransmisores es el principal mecanismo de transferencia de información entre neuronas. Las moléculas de neurotransmisión son moléculas dispuestas en organelos especializados llamados vesículas sinápticas (VS's), de donde son liberadas al recibirse el estímulo del impulso nervioso. El área en donde se lleva a cabo tal liberación, se le llama "zona activa". La liberación es un proceso de múltiples pasos: fijación de un blanco de VS's para la liberación; anclaje de VS's a la membrana de la zona activa; preparación para la rápida liberación a la llegada del estímulo; fusión o exocitosis para permitir la descarga del neurotransmisor y finalmente la reintegración de la membrana de las VS's por endocitosis (Valtorta and Benfenati, 1995).

En estudios recientes se ha demostrado que la interacción entre diferentes neurotransmisores que se activan durante la formación de la memoria produce cambios morfológicos a nivel celular. Dichos cambios originan modificaciones considerables a nivel sináptico, como el número y la densidad de las sinapsis de algunas regiones que participan activamente en la formación de la memoria, a esto se le llama plasticidad sináptica, que en síntesis son los cambios en la eficiencia de la transmisión sináptica (Bear et al., 1996; Dudai et al., 1989; Rusakov et al., 1997).

Como se ha mencionado anteriormente, una de las estructuras que más se ha relacionado con la memoria y el aprendizaje es el hipocampo, el cual posee varios sistemas de neurotransmisión. El principal neurotransmisor que provoca una activación en esta estructura es el ácido glutámico, mejor conocido como glutamato. Los receptores de glutamato han sido identificados

como interfaces importantes en memoria y aprendizaje, así como en mecanismos de plasticidad como LTP y LTD, los cuales se piensa que son una de las bases celulares de algunas formas de aprendizaje. La actividad de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) y el receptor tipo NMDA es esencial para la inducción y el mantenimiento de la LTP (Riegel, et al., 1996). El bloqueo del receptor tipo NMDA por medio de antagonistas tales como el APV daña la formación de la LTP y la memoria espacial (Op. cit. en Morris, R. G., et al., 1997). Entre otros sistemas de neurotransmisión en el hipocampo se encuentran el noradrenérgico y el serotoninérgico los cuales están implicados en la formación de las ondas theta (θ), que son un potencial generado por una población celular hipocámpal, y su presencia está relacionada con el comportamiento exploratorio de los animales, movimientos cíclicos y durante el sueño MOR (movimiento ocular rápido). La administración de un inhibidor de síntesis de serotonina (PCPA), atenúa marcadamente las ondas θ mientras que la administración de un antagonista de noradrenalina (5-HT_3) incrementa la frecuencia de las ondas θ de una manera dosis-dependiente (Op. cit. en Mongeau, R., et al., 1997).

La participación de los diferentes sistemas de neurotransmisión que arriban al hipocampo es amplia, sin embargo, el que se ha identificado con una mayor importancia en los procesos de memoria y aprendizaje es el sistema colinérgico.

3.1.- Acetilcolina y memoria espacial

La acetilcolina (ACh) fue el primer compuesto en ser identificado como un neurotransmisor en el sistema nervioso central. Desde 1920 se han llevado a cabo estudios en animales que han dado bases sólidas del importante papel que tiene el sistema colinérgico en los procesos de memoria y aprendizaje (Hagan and Morris, 1987). En el laberinto acuático de Morris el papel de este sistema de neurotransmisión ha sido estudiado mediante la medición del déficit de aprendizaje producido por: lesiones de grupos celulares en núcleo basalis

magnocellularis o en septum medial (McNamara and Skelton, 1993). Dicho bloqueo farmacológico en receptores muscarínicos de ACh daña la capacidad de ubicación de los animales en el laberinto acuático. Por ejemplo la administración sistémica o i.c.v. de escopolamina (un antagonista muscarínico no selectivo) causa un daño en el aprendizaje y memoria (Buresova, et al., 1986).

El sistema colinérgico es una de las vías mejor descritas en la literatura, sus proyecciones están bien definidas en humanos, primates no humanos y ratas. Esta vía se divide en dos grupos. El primero que se encuentra en el cerebro basal anterior (CBA), y se compone del área septal medial (ASM), el núcleo de la banda diagonal de Broca vertical y horizontal así como del núcleo basal magnocelular (NBM), el cuál en humanos recibe el nombre de núcleo basal de Meynert (Mesulam, Mufson, Wainer y Levey, 1983). Y el segundo grupo distingue las neuronas que se encuentran en el tallo cerebral en la región del núcleo tegmental del pedúnculo pontino (PPTg) y el tegmentum pontino laterodorsal (Rye, Saper, Lee y Waine, 1987).

Este sistema de neurotransmisión posee dos tipos de receptores; los nicotínicos o ionotrópicos y los muscarínicos o metabotrópicos cuya principal diferencia es el tipo de mecanismo efector que presentan, iones y proteínas G respectivamente. Los receptores muscarínicos, se dividen en 5 subtipos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5) los cuales se subdividen en receptores pre-sinápticos (M_2 y M_4) y en receptores post-sinápticos (M_1 , M_3 y M_5) (Van der Zee, E. and P. Luiten, 1999).

La liberación de ACh en el hipocampo durante el desempeño de una memoria espacial aprendida y el mejoramiento en la resolución de un laberinto radial ha sido correlacionado positivamente con el incremento en la liberación de este neurotransmisor durante los 12 días posteriores al entrenamiento (Fadda, et al. 2000). Estos resultados muestran que el aprendizaje de una tarea espacial modifica la función de las neuronas colinérgicas que proyectan al hipocampo, las cuales comienzan a ser progresivamente más activas. En un paradigma conductual de orientación espacial, Van der Zee (1995) muestra que

la discriminación espacial incrementa selectivamente la inmunoreactividad de los receptores muscarínicos en las células piramidales de CA1, sugiriendo la activación y aumento de los receptores muscarínicos en esta zona.

3.1.1.- Receptores Muscarínicos

Los receptores muscarínicos de ACh (mAChR, por sus siglas en inglés muscarinic Acetylcholine receptor) han sido considerados como unos de los receptores reguladores de la plasticidad sináptica hipocampal (Shinoe, et al., 2005). Como se mencionó anteriormente, existen cinco distintos subtipos de mAChRs (M1 – M5 subtipos) que ya han sido genéticamente identificados (Caulfield and Birdshall, 1998). Los receptores post-sinápticos (M1, M3 y M5), se acoplan a una proteína G que activa a la Fosfolipasa C, mientras que los receptores pre-sinápticos (M2 y M4), se acoplan a una proteína G que inhibe la adenilato ciclasa. El hipocampo expresa los 5 subtipos de los receptores muscarínicos (Fishan et al., 2002), en donde modulan varios canales iónicos y regulan la excitabilidad de las neuronas (Nicoll et al., 1990); siendo el receptor M5 el que se expresa en menor cantidad (Van der Zee, 1999). La aplicación de agonistas a estos receptores en rebanadas hipocampales produce oscilaciones (Fishan et al., 2002), las cuales modulan la inducción hipocampal de LTP (Shimoshige et al., 1997). De hecho, el mal funcionamiento del sistema colinérgico en algunos desordenes mentales causa daño en la memoria (Blokland, 1996). En la enfermedad de Alzheimer ha sido reportado que las terminales colinérgicas pierden densidad incluyendo las del hipocampo (Rodríguez-Puertas et al., 1997). Aunado a esto se ha encontrado un decremento de receptores M1 relacionado con la edad en la región de CA1 (Tayebati et al., 2002).

3.1.2.- Receptores Muscarínicos subtipo M1 y M3

La distribución diferencial de los subtipos de receptores muscarínicos en el cerebro, sugiere que el subtipo M1 podría ser particularmente importante durante el proceso de memoria, ya que este receptor se encuentra en grandes cantidades en áreas del cerebro anterior como la amígdala, hipocampo y la corteza cerebral (Levey et al., 1991; Wei et al., 1994), donde las sinápsis parecen mediar la adquisición y almacenamiento de la nueva información (Fibiger et al., 1991; Prado-Alcalá et al., 1993).

Según el estudio de Wei, et al., 1994, acerca de la distribución de los receptores muscarínicos utilizando una técnica de RT-PCR y HPLC, pudo observar que la expresión del receptor muscarínico M3 se encuentra distribuida de manera uniforme en el cerebro presentando una modesta disminución rostro-caudal. Entre las estructuras en las que se localiza en gran concentración este receptor se encuentran; corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, tálamo, entre otras.

3.2.-Proteínas de la Vesícula sináptica

La caracterización de las proteínas de la VS es el primer paso para comprender el mecanismo molecular que conlleva a la liberación de un neurotransmisor. Las proteínas de VS's pueden ser divididas en dos clases, que corresponden a dos principales funciones; la primera son las proteínas de transporte y la segunda consiste en las proteínas ligadas al movimiento hacia un blanco y las reacciones de fusión y fisión de la vesícula al botón sináptico (Südhof and Reinhard, 1991). Las vesículas sinápticas deben navegar a través de la terminal nerviosa por medio del citoesqueleto; dicha navegación es mediada por sinapsinas, una familia de proteínas de membrana muy abundante que fue descubierta por Paul Greengard (Op. cit. en Jonson et al., 1972). Las sinapsinas son específicas para VS's en las neuronas y unen diversos elementos del citoesqueleto; sugiriendo un papel general en la guía de la VS's

hacia los sitios de liberación (Südhof et al., 1989). Existen otras proteínas tales como Rab 3A la cual indica el sitio blanco en donde será liberado el neurotransmisor (Walworth et al., 1989); sinaptotagmina que ayuda al anclaje y fusión de las vesículas (Pfenninger et al., 1972); sinaptofisina que es una proteína integral de membrana que ha sido un magnífico candidato para la formación del poro para la exocitosis (Rahamimoff, et al., 1988); y algunas otras más como las sinaptobrevinas, etc. (Op. cit. en Südhof, et al., 1991).

3.2.1.-Sinaptofisina, proteína abundante en membrana de VS's

Una de las proteínas más abundantes de membrana en las vesículas sinápticas, es la sinaptofisina, la cual llega a comprender hasta el 8% del total de proteínas de la vesícula (Knaus et al., 1990). La sinaptofisina (Syp, abreviatura en inglés, Synaptophysin) fue la primer proteína integral de membrana en ser aislada; es una glicoproteína con un peso de 38,000 daltones (Wiedenmann, et al., 1985), sin embargo, su papel en el ciclo de vida de la vesícula sináptica no ha sido determinado. Contiene cuatro regiones transmembranales y un carboxilo terminal que consiste en diez pentapéptidos repetidos, nueve de los cuales son iniciados por un residuo de tirosina, sugiriendo que puede ser blanco de cinasas de tirosina y que dicha fosforilación podría ser central para su función (Evans et al., 2005). La identificación de Syp como un componente molecular selectivo y permanentemente asociado a la membrana de VS's abre la posibilidad de usar anticuerpos a esta proteína para trazar los movimientos de las VS's en la neurona, abriendo un poco el camino para conocer los mecanismos de tráfico de membrana; ya que esta proteína sola o en asociación con proteínas homólogas está envuelta en múltiples e importantes aspectos de la exocitosis de VS's, incluyendo el ensamble del complejo SNARE, la formación del poro de fusión, la activación de endocitosis y la biogénesis de la vesícula sináptica (Op cit. en Valtorta, et al., 2004). Por razones como ésta, Syp es el marcador inmunohistoquímico más usado para la determinación de densidades sinápticas (Morrison, et al., 2000; Wick, 2000).

II. Antecedentes

Los estudios acerca del papel de ACh en funciones cognitivas han utilizado inyecciones sistémicas o intracerebroventriculares (i.c.v.) de drogas colinérgicas o bien, se han provocado lesiones de este sistema para así examinar sus efectos sobre el comportamiento, memoria y aprendizaje. El uso de microinyecciones directamente al parenquima cerebral ha permitido que se examinen los efectos de drogas que incrementan o decrementan la función de ACh en diferentes sistemas de memoria. Varios estudios indican que la inyección directa de agonistas y antagonistas en amígdala, estriado e hipocampo generalmente favorece o daña respectivamente el aprendizaje y la memoria en pruebas asociadas con estos sistemas neuronales (Carli, Lschi and Samanin, 1997; Degroot and Parent, 2000).

Las Manipulaciones farmacológicas del septum medial, frecuentemente asociadas con marcadores de ACh y sus funciones en el hipocampo, apoyan la idea de un aumento o decremento en las funciones del hipocampo mejora o deteriora el aprendizaje y memoria, respectivamente (Degroot and Parent, 2000; Durkin, 1992). Además, las lesiones electrolíticas o neurotóxicas en el septum medial resultan en un daño severo en memoria y aprendizaje en tareas relacionadas con hipocampo (Op. Cit. en Gold, 2003). Inyecciones intraseptales de morfina dañan la memoria y decrementan la liberación de ACh en el hipocampo (Ragozzino and Gold, 1995). La inyección sistémica de glucosa aumenta la liberación de ACh al hipocampo durante el entrenamiento y mejora la memoria (Ragozzino, Pal, Unick, Stefani and Gold, 1998), en éste y muchos estudios más, el aumento o disminución en la liberación de ACh en el hipocampo está estrechamente relacionado con el efecto de la mejora o el daño sobre el aprendizaje y la memoria.

La inyección i.c.v. de neuroesteroides como pregnenolona, mejora la memoria espacial y aumenta la liberación de ACh en el hipocampo (Darnaudery, et al., 2000). En cambio, las inyecciones intra-hipocampales de

neuropeptidos como galanina, provoca un daño en la memoria espacial y un decremento en la liberación de ACh (Ogren et al., 1996).

Cuando se administra sistémicamente escopolamina, antagonista muscarínico no selectivo, causa amnesia para diversas tareas conductuales en ratas, sugiriendo la participación de la transmisión colinérgica mediada por receptores muscarínicos en el proceso de memoria y aprendizaje. Cuando la escopolamina es inyectada directo en el hipocampo inmediatamente después del entrenamiento causa amnesia retrograda, revelando una participación activa de los receptores muscarínicos en esta estructura para la consolidación del trazo de memoria (Op. Cit. en Ferreira, A. R., et al., 2003). Existe una creciente evidencia acerca de la influencia de los tratamientos colinérgicos sobre la memoria vía receptores muscarínicos, proponiendo que estos son un componente crítico en la modulación de la consolidación de la memoria (Power, A. E., et al., 2003)

Recientemente se ha observado que dentro del sistema colinérgico los receptores muscarínicos M1 tienen un papel muy importante en memoria. El sistema de neurotransmisión colinérgico en el hipocampo ha sido estudiado mediante diversas tareas de memoria y aprendizaje por ejemplo; Shinoe, et al., en su trabajo del 2005 encuentran que la administración de una baja concentración de Carbacol (agonista muscarínico no específico) aumenta la LTP de la transmisión excitatoria sináptica en rebanadas hipocampales, dicho efecto fue notablemente disminuido en ratones Knock-out para receptores M1 mientras que en ratones Knock-out para receptores M3 no se presentaba tal resultado, a pesar de que la LTP sin efecto de agonistas se mantenía intacto en ambas cepas mutantes. Así mismo, Shinoe et. al., encuentran que la estimulación repetitiva en el stratum oriens, el cual se piensa que activa la liberación endógena de ACh, puede aumentar la LTP en ratas de cepa silvestre, mientras las mutantes para M1 no presentan dicho incremento. Sugiriendo así, que la liberación fisiológica de ACh desde las fibras colinérgicas modula la plasticidad sináptica hipocampal a través de la activación de receptores post-sinápticos M1. Se podría pensar entonces que la modulación fisiológica de LTP por acción de ACh podría ser el primer paso en la facilitación

de la formación de la memoria en el hipocampo y que el receptor muscarínico M1 podría estar participando de forma importante en este proceso.

Ramírez-Amaya et al., (1999) observan un incremento de las proyecciones de las fibras musgosas del stratum oriens, en la subregión de CA3 en el hipocampo en los animales sobreentrenados (con más de tres días de entrenamiento) en el laberinto acuático de Morris, efecto que no se observó en los grupos control (aquellos a los que se les impidió la localización espacial de la plataforma), ellos consideran que el incremento de las proyecciones de las fibras musgosas y la ejecución y desempeño durante la tarea tienen una correlación; dicha correlación podría ser entre la sinaptogénesis y la formación de la memoria espacial. El papel fisiológico de las nuevas sinápsis se desconoce, pero por su localización se piensa pudieran tener implicaciones funcionales. Otra propuesta es que las fibras musgosas modulan la actividad de las células de CA3 en donde los eventos plásticos podrían estar permitiendo la codificación de la información (Ramírez-Amaya et al., 2001). En un experimento anexo, Ramírez-Amaya, et al., (2001) antagonizan a los receptores NMDA con APV antes y después de la presentación de la tarea espacial, nuevamente el laberinto acuático de Morris, observando que al inyectar antes de la adquisición se produce un déficit en el desempeño de esta durante los primeros dos días; sin embargo en los siguientes tres días alcanzan la asintota en la curva de aprendizaje. Durante la prueba de MLP el grupo experimental presenta un déficit muy marcado con respecto a su control. Así mismo el área de la doble banda se ve disminuida en el grupo experimental antagonizado con APV.

Así, los cambios morfológicos observados tras el sobreentrenamiento en un laberinto acuático pueden estar relacionados con la efectividad sináptica y la excitabilidad de las células piramidales de la región de CA3 que es modulada principalmente por las fibras musgosas, este cambio morfológico puede representar un importante evento de alteración de la actividad de las células piramidales (Ramírez-Amaya et al., 1999).

La hipótesis de que el receptor subtipo M1 media el almacenamiento de la memoria está sustentada por numerosos trabajos que muestran que las inyecciones i.c.v. o intrahipocampal de pirenzepina dañan la expresión de diferentes respuestas condicionadas (Caufield et al., 1983; Messer et al., 1990; Ohno et al., 1994; Sala et al., 1991).

En trabajos recientes de nuestro laboratorio hemos podido estudiar la participación del sistema colinérgico sobre la memoria en la región específica de CA3 del hipocampo en donde observamos que la microinyección de escopolamina en esta región antes del entrenamiento en el laberinto de Morris, provoca que la adquisición de esta tarea se vea afectada; sin embargo, si esta microinyección se lleva a cabo después de haber expuesto a los animales al laberinto acuático no se encuentra ningún efecto significativo sobre la adquisición o en la consolidación (Herrera-Morales, W., et al. En prensa).

En los trabajos de Ramirez- Amaya, et al., (1999) se muestra el aumento en la densidad de las sinapsis en la subregión de SO en el área de CA3, utilizando la tinción de Timm sin dar claridad a la funcionalidad de dichas sinapsis, pues solo marca sinapsis pero no es un indicador de funcionalidad. En el caso de la sinaptofisina, ha permitido un gran número de investigaciones acerca de la liberación de neurotransmisor y el posible rol primordial de esta glicoproteína. Alder, et al., (1992) al microinyectar anticuerpos o fragmentos F(ab) contra Syp en blastómeros de embriones de un día de *Xenopus* antes de colocarlas en cultivo o en motoneuronas espinales y por medio de un análisis Patch-clamp observaron que la inyección de anticuerpos de Syp redujo significativamente la frecuencia de la secreción espontánea de ACh, sin afectar la amplitud de la corriente sináptica espontánea, estos resultados sugieren que Syp es requerida para la liberación de neurotransmisor. En 1995, Alder, et al., inducen la sobreexpresión de Syp en embriones de *Xenopus*, dando como resultado un fuerte incremento en la frecuencia, pero no en la amplitud de las corrientes sinápticas espontáneas. Sugiriendo que Syp no está implicada en determinar la cantidad de neurotransmisor liberado sino en la excitación y el acoplamiento de la VS para la secreción (Op. Cit en Valtorta, et al., 2004).

2.1 Planteamiento del problema

Dada la importancia de los receptores muscarínicos post-sinápticos y su amplia presencia en el hipocampo, así como su participación en eventos plásticos tales como LTP y sinaptogénesis, se desarrolló un protocolo para poder observar la participación de dichos receptores muscarínicos en la adquisición y/o consolidación de una memoria espacial. Para tal propósito se administraron dos diferentes antagonistas, el selectivo de receptores M1 (Pirenzepina) y el selectivo de receptores M3 (4-DAMP), cada uno con su respectivo control; con el objetivo de determinar su participación durante el proceso de memoria y aprendizaje en una tarea espacial y si este papel es similar o distinto en tal proceso como lo es en la LTP.

Se ha mostrado en trabajos anteriores (Ramírez-Amaya et al.,1999; 2001), que con el sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris, se produce en los organismos una doble banda, es decir, un aumento en la densidad de las terminales de las fibras musgosas en el SO del área CA3, estos autores proponen que dicho aumento de densidad podría estar relacionada con la consolidación de la memoria espacial, sin embargo, aun no se ha probado que esta doble banda tenga un efecto funcional en la consolidación. Por lo anterior, en este trabajo proponemos que mediante la ayuda de una proteína como Syp, la cual es un marcador de densidades sinápticas ampliamente reconocido, y el Western Blot, observaremos el cambio en la expresión de esta proteína y así tener una aproximación a la posible funcionalidad de esta doble banda.

III. HIPOTESIS

1) Si los receptores muscarínicos post-sinápticos están involucrados en la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial, entonces, la antagonización de dichos receptores provocará un déficit en la memoria espacial.

2) Si existe efecto en adquisición y/o consolidación por la antagonización de estos receptores post – sinápticos en memoria espacial, y estos procesos están asociados a la sinaptogénesis, entonces, se observará un cambio en la expresión de Syp en la región de CA3 del hipocampo con respecto a los controles.

IV. OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

Determinar la participación de los receptores muscarínicos post-sinápticos (M1 y M3) durante la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial.

4.2.- Objetivos particulares

Evaluar y determinar la participación de los receptores M1 durante la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial

Evaluar y determinar la participación de los receptores M3 durante la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial

Determinar si existe una relación entre la adquisición y/o la consolidación de una tarea espacial y la expresión de sinaptofisina en la región hipocámpal de CA3.

V. Material y Método

Para llevar a cabo los objetivos anteriormente descritos se diseñó el siguiente experimento, se inyectó bilateralmente en el hipocampo en la región de CA3 el antagonista de los receptores M1 (Pirenzepina), ó el antagonista de los receptores M3 (4-DAMP) ó el vehículo (Ringer) antes del entrenamiento en el paradigma conductual, descrito posteriormente. Y de esta manera se determinó la participación de los diferentes receptores muscarínicos post-sinápticos en la formación de la memoria espacial.

Para determinar si hay cambios en la cantidad de Syp en el área de CA3 debidos al aprendizaje se diseñó un experimento en donde, se utilizaron grupos de control de nado de 1 y 4 días y dos grupos más de animales entrenados por 1 y 4 días; para observar si existe un cambio en la cantidad de Syp entre grupos que adquieren una tarea espacial y los que no.

Una vez terminado este experimento procedimos a inyectar en nuevos grupos de animales el antagonista o el vehículo bilateralmente en la región de CA3 y analizamos los cambios en la expresión de Syp en individuos expuestos a la tarea 1día (Ringer y Pirenzepina), 4 días (Ringer y Pirenzepina) y 11días (Ringer y Pirenzepina); mediante el análisis de Western Blot en los diferentes grupos.

5.1.- Sujetos

Cien ratas macho albinas de la cepa Wistar con peso entre 250 – 280 gramos al momento de la cirugía. Alojados en cajas estándar individuales de acrílico. Todos los animales se mantuvieron en el mismo cuarto con una temperatura promedio de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, con comida y agua *ad libitum*; con un ciclo invertido luz-obscuridad controlado de 12 hrs, con las luces encendidas a partir de las 7:00 pm. Todos los animales fueron tratados según las reglas del

Ministerio de Salud de México. Y bajo la aprobación del comité local de cuidado y uso animal.

5.2.- Cirugía

Los animales se implantaron bilateralmente mediante el uso de un aparato estereotáxico con cánulas de acero inoxidable, mientras se encontraban bajo el efecto de anestesia (hidrocloruro de ketamina, 80 mg/ml intraperitoneal y xilazina 12 mg/ml intraperitoneal).

Las puntas de las cánulas fueron colocadas 1.5 mm por encima del hipocampo (AP = -3.0 mm; L = +/- 3.4 mm; DV = -1.5 mm a partir de Bregma; Paxinos, G. and C. Watson, 1986), de manera que las coordenadas de la punta del inyector son AP = -3.0 mm; L = +/- 3.4 mm; DV = -3 mm (Paxinos, G. and C. Watson, 1986). Dichas cánulas guía fueron sujetadas en el cráneo por medio de tornillos y cemento dental de acrílico. Para evitar la infección de los animales las cánulas fueron selladas con mandriles. Los animales se recuperaron durante una semana post-cirugía y posteriormente se manipularon por el experimentador una semana antes de iniciar el experimento, con el fin de habituarlos.

5.3.- Procedimiento conductual

El entrenamiento fue llevado a cabo en un laberinto acuático, dispositivo circular lleno de agua con paredes y piso de color negro, dicho dispositivo se divide en cuatro cuadrantes y cuenta con una plataforma colocada en el centro de alguno de ellos sumergida 1cm por debajo del agua. La plataforma y las claves espaciales que se encuentran alrededor del laberinto se mantienen siempre en el mismo sitio durante todo el entrenamiento. El trayecto que siguen los animales durante el nado fue grabado usando un sistema Chromotrack

(Instrumentos de San Diego). El entrenamiento de las ratas en el laberinto acuático consistió de 4 sesiones idénticas de diez ensayos cada uno. En cada ensayo el animal fue introducido al dispositivo empezando de diferentes puntos, al finalizar los 10 ensayos los animales eran colocados en el vivario. En cada ensayo, los animales nadaban un máximo de 60s o bien, hasta que llegaran a la plataforma; ahí permanecían 30s sobre la plataforma y después se mantenían en espera en una caja de acrílico por otros 30s. Si el animal no llegaba a la plataforma en 60 segundos era guiado hacia ésta.

Tras el entrenamiento de cuatro sesiones, los animales fueron colocados en el vivario por una semana para después ser examinados al término de este tiempo en el laberinto acuático durante la prueba de memoria de largo plazo. La cual consiste en un sólo intento de 120 segundos sin la plataforma dentro del dispositivo. Durante esta prueba se miden, el tiempo que tarda en llegar el animal al lugar donde estaba la plataforma durante el entrenamiento (latencia), así como el número de veces que cruza por el área en donde se localizaba la plataforma (número de cruces).

5.4.- Microinyección y Fármacos

La microinyección bilateral en el área de CA3 del hipocampo se llevó a cabo por medio de agujas dentales conectadas al tubo teflón de una jeringa Hamilton de 10µl montada en una bomba de microinfusión, dichas agujas fueron guiadas a través de las cánulas implantadas bilateralmente en esta área del hipocampo. Un volumen de 0.5µl fue liberado durante 120s por lóbulo, de vehículo o de fármaco. Después de 120s de periodo de difusión adicionales, el inyector fue removido y los mandriles colocados en su lugar.

Para la parte conductual del análisis de la participación de los receptores muscarínicos post-sinápticos se inyectaron cinco grupos: Pirenzepina con n=12 (42.43 µg/µl, pirenzepina, Sigma, St. Louis, MO), con su respectivo vehículo, n=14 (Solución Ringer: 118 mM NaCl/4.7 mM KCl/ 1.2mM KH₂PO₄/1.2 mM MgSO₄/ 2.5 mM CaCl₂ * 2H₂O) y dos grupos con dosis diferentes de 4-DAMP

(2.1 µg/µl con n= 8 y 4.2 µg/µl con n= 6, 4-DAMP methiodide, Sigma, St. Louis, MO), con su respectivo vehículo n= 8.

Para el análisis de expresión de sinaptofisina se realizó el procedimiento anteriormente mencionado teniendo seis grupos:

Grupos experimentales.

- 1) Ringer 1 día (n= 5)
- 2) Ringer 4 días (n= 8)
- 3) Ringer 11 días (n= 6)
- 4) Pirenzepina 1 día (n= 5)
- 5) Pirenzepina 4 días (n= 10)
- 6) Pirenzepina 11 días (n= 10)

Al finalizar los experimentos para el análisis de la expresión de syp, los animales fueron sacrificados inmediatamente después del último entrenamiento o prueba; mediante el uso de guillotina, y se extrajeron las áreas de CA3 y GD del hipocampo dorsal por microdissección.

5.5.- Procedimientos histológicos

Posterior a los experimentos conductuales los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos intracardialmente con una solución salina isotónica (0.15 M), y posteriormente solución de paraformaldehído al 4% (en buffer fosfatos 0.1M, pH 7.4). Al finalizar, los cerebros fueron extraídos y sumergidos en el mismo fijador, para después ser colocados en sacarosa 30% hasta que se hundieron, después fueron cortados en congelación en rebanadas 40µm y se tiñeron con violeta de cresilo para observar la posición de la cánula. Finalmente fueron examinados a través de microscopia de luz 10x para determinar si las cánulas se encontraban en el lugar correcto.

En el caso de los animales para western blot, los animales fueron decapitados inmediatamente después del último entrenamiento según el grupo al que pertenecían 1 o 4 días de entrenamiento u 11 días o sea, tras la prueba de memoria a largo plazo. Se extraía el cerebro, se hacía un corte coronal al área del hipocampo para observar la colocación de las cánulas y solo aquellos individuos en donde las cánulas fueron bien implantadas se seleccionaron para la extracción del área de CA3 y Giro dentado.

5.6.- Homogenización

Para los experimentos de expresión de sinaptofisina las ratas fueron decapitadas y se les extrajo la región de CA3 y GD del hipocampo dorsal. El tejido es colocado en buffer de lisis (50nM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 tableta de inhibidor de proteasas, ROCHE), homogenizado por medio de un sonicador, Branson Sonifier 250 y congelado a -72 °C.

5.7.- Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas en la muestra fue determinada mediante el método de Lowry (Kit BIO-RAD), midiendo cada muestra por cuadruplicado.

5.8.- Western Blot

En cada muestra fueron diluidos 30 µg de homogenado 1:1 en solución Laemli buffer con 5% de B-mercaptoethanol y se hirvieron durante 5 minutos.

Se cargaron las muestras en geles de acrilamida 12% y fueron montados en una cámara de Western Blot (BIO-RAD); el gel está formado por un gel separador pH 8.8 al 12% (Tris 37.29 mM pH 8.8, SDS 3.4 mM, acrilamida 70 mM, 5µl de TEMED y APS 21.79 mM) con un gel concentrador pH 6.8 al 4.5% Tris pH 6.8 0.12 M, SDS 51 mM, acrilamida 32 mM, 5µl de

TEMED y APS 6.4 mM). El gel cuenta con 10 carriles en donde se colocó un marcador de peso molecular, 6 muestras y un homogenado total. Una vez cargados los geles en la cámara se conectó a un regulador Power Pac 200 de BIO-RAD a 180V por 90 minutos a temperatura ambiente, en buffer de corrida (Tris Base 25 mM, Glicina 0.19 M, SDS 2.88 M).

Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad); las membranas y los geles se equilibraron en buffer de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 0.19 M, SDS 2.88 M y Metanol 20%) por 20 minutos. En la cámara de transferencia semi-seca Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell; se conecto la cámara a un regulador a 25V por 40 minutos. Terminada la transferencia se colocó la membrana en BSA al 5% diluido en TBS-T (Tris base 9.9 mM, NaCl 0.15 M, y Tween al 0.1%) y se dejó toda la noche a 4°C.

Las membranas se colocaron en el anticuerpo primario (Synaptofisina, SIGMA, 1.3 : 20,000); y se dejó por 90 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Al terminar se hicieron cinco lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T. Se colocó el anticuerpo secundario (anti-mouse, Zygmund 1:3,000) y se dejó noventa minutos a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación se hicieron 5 lavados de 5 minutos cada uno en TBS-T. Posteriormente las membranas fueron colocadas en la solución de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate de PIERCE). Finalmente se reveló con placa reveladora Kodak BioMax MR Film, Scientific imaging film.

5.9.- Análisis de imágenes

Las placas fotográficas fueron digitalizadas y las densidades de píxeles fueron determinadas por medio del programa Image J.

5.10.- Análisis de membranas

Todas las membranas fueron teñidas en Coomasie para observar la correcta posición de las columnas de corrimiento y el cargado de las proteínas.

5.11.- Estadística

1) Parte Conductual

Los datos de las curvas de aprendizaje fueron analizados por medio de una ANOVA de medidas repetidas y una prueba *post hoc* de Fisher. Los datos de las pruebas de MLP fueron analizados por medio de una ANOVA factorial de una vía.

2) Análisis de Geles

En los geles se agregó un séptimo carril de Homogenado Total de corteza (HT), siendo tomadas todas las alícuotas de la misma muestra original, y usando la misma cantidad de proteínas que los demás carriles. Este homogenado se tomó como el 100% y se hizo la comparación con los demás carriles usando los valores obtenidos mediante el análisis de densidad óptica. Una vez obtenidos los porcentajes de homogenado total, se capturaron los datos de todos los geles y se llevó a cabo la estadística. Estos datos de densidad fueron analizados por medio de una ANOVA de medidas repetidas.

VI. RESULTADOS

6.1.- Cortes histológicos de hipocampo

En la figura 2 se muestra un corte histológico representativo de la posición en la cual fueron colocadas las cánulas en las ratas. Se puede observar que la microinyección se localiza en la región de CA3 del hipocampo. Todos aquellos animales que mostraron una mala colocación de la cánula fueron excluidos del análisis estadístico, permitiendo analizar una $n = 48$. Fueron excluidos: Ringer= 3, 4-DAMP 4.2= 1, Pirenzepina 1D= 1, Pirenzepina 4D= 2 y Pirenzepina 11D= 2.

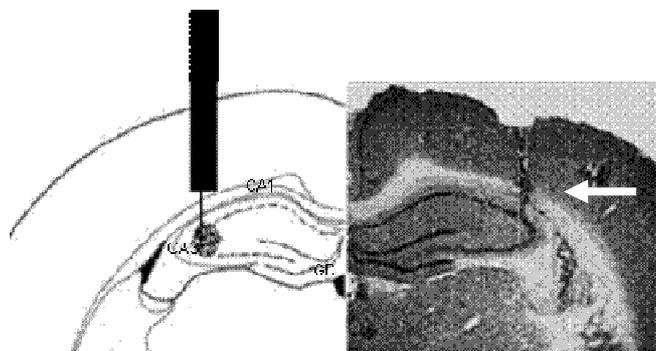


Fig. 2. Del lado izquierdo se muestra un mapa de un corte cerebral de Hipocampo (Paxinos, 1986), en donde se puede observar los puntos en donde se realizaron las microinyecciones y las regiones del hipocampo (GD, CA3 y CA1). En el lado derecho de la figura se muestra una fotografía de un corte histológico donde se observa el lugar en el cual estaban las cánulas.

6.2.- Efecto de los antagonistas específicos de los receptores muscarínicos post-sinápticos M1 y M3 en la adquisición de una tarea espacial

En la figura 3 se observa la curva de aprendizaje de los grupos: Pirenzepina ($n = 12$) y Vehículo ($n = 12$) durante los cuatro días de entrenamiento. Mediante el análisis estadístico de ANOVA de medidas repetidas no se encontró diferencia significativa entre los grupos, lo cual muestra que ambos grupos aprendieron de manera similar.

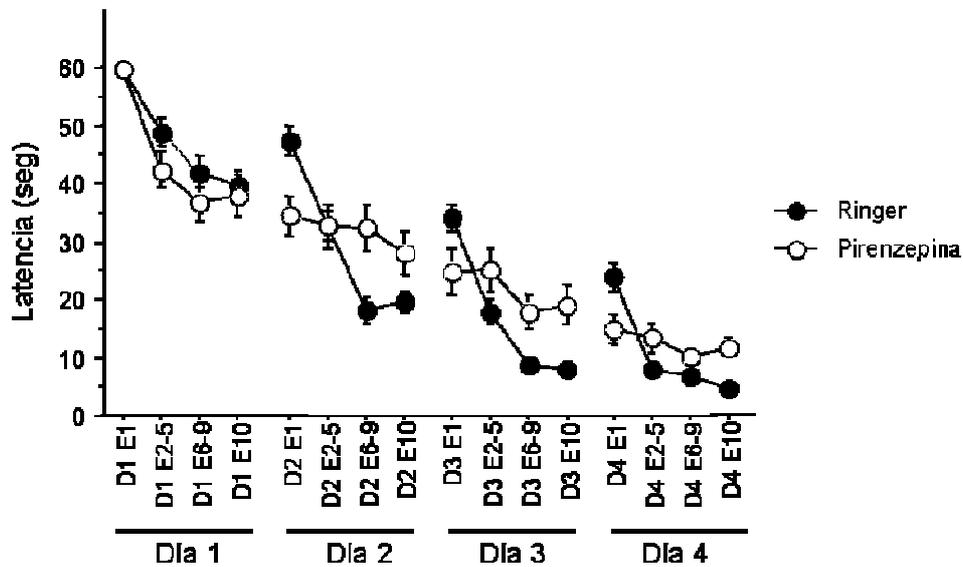


Fig. 3. Curva de aprendizaje de los grupos Ringer y Pirenzepina. En el eje de las X observamos los días de entrenamiento, en cada día se observan cuatro puntos, siendo el primero y el último, el ensayo 1 y 10 respectivamente y los dos puntos intermedios muestran el promedio de los ensayos 2 al 5 y 6 al 9. En el eje de la Y se observa la latencia medida en segundos de cada uno de los ensayos o promedios por día.

En la gráfica de la figura 4, se muestran los grupos inyectados con las diferentes dosis del antagonista selectivo de los receptores M3 (4-DAMP) y su ringer.

En los grupos inyectados con las diferentes dosis del antagonista selectivo de los receptores M3 (4-DAMP) y su ringer. Ringer n= 7, DAMP 2.1 n= 7 y DAMP 4.2 n= 6 (Figura 4) no se encontró diferencia significativa entre los grupos.

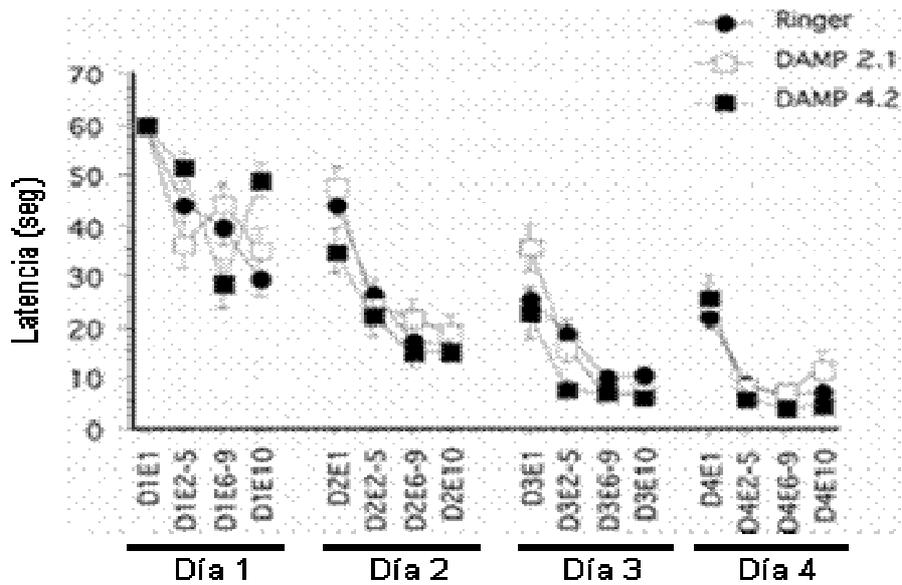


Fig. 4. Curva de aprendizaje de los grupos Ringer y 4-DAMP (2.1 y 4.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En el eje de las X observamos los días de entrenamiento, en cada día se observan cuatro puntos, siendo el primero y el último, el ensayo 1 y 10 respectivamente y los dos puntos intermedios muestran el promedio de los ensayos 2 al 5 y 6 al 9. En el eje de la Y se observa la latencia medida en segundos de cada uno de los ensayos o promedios por día.

6.3.- Efecto de los antagonistas de los receptores M1 y M3 en la consolidación de una memoria espacial

En la prueba de memoria a largo plazo se encontró una diferencia significativa entre los grupos Ringer ($n= 12$) y Pirenzepina ($n= 12$); ($F_{1, 23}= 16.551$, $P<0.01$) en latencia así como en el número de cruces ($F_{1, 23}= 14.839$, $P<0.01$). (Fig. 5)

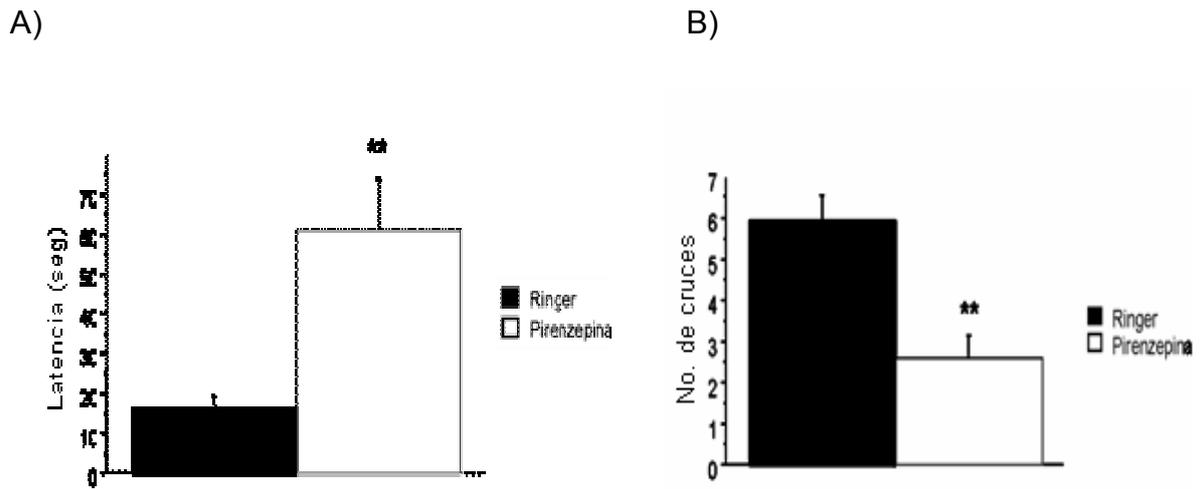


Fig. 5. Efecto de Pirenzepina durante prueba de MLP. A) En el eje de la Y se muestra la latencia medida en segundos durante la prueba de MLP. B) Número de cruces por donde estaba la plataforma durante la prueba de MLP. **= $P < .01$.

En los grupos tratados con 4-DAMP (DAMP 2.1 $n=7$, DAMP 4.2 $n=6$) y Ringer ($n=7$), no se encontró diferencia significativa en latencia ni en número de cruces durante la prueba de MLP en comparación a sus controles (Figura 6).

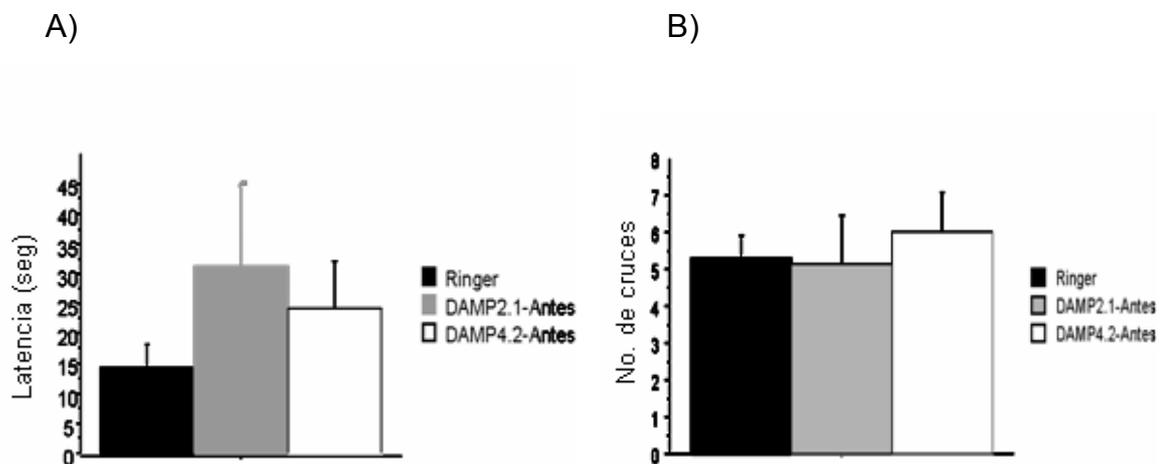


Fig. 6. Efecto de 4-DAMP sobre durante la prueba de MLP. En A observamos la latencia medida en segundos (eje Y) de cada uno de los tres grupos durante la prueba. En B se presenta el número de cruces de cada uno de los grupos durante la prueba de MLP.

Una vez analizados estos datos, observamos que la antagonización de los receptores M1 y M3 no produce ningún efecto significativo durante la adquisición de una tarea espacial; sin embargo, durante la prueba de MLP, observamos un déficit significativo en el grupo tratado con Pirenzepina, efecto no encontrado en el grupo tratado con 4-DAMP.

6.4.- Cambio en la cantidad de Syp en el área de CA3 en ratas entrenadas y control de nado

Este experimento preliminar tuvo como objetivo la observación del cambio en la cantidad de Syp en el área de CA3, en dos grupos diferentes, aquellos que fueron sobreentrenados (n=4), y los de control de nado (n=4). En la figura 7 podemos observar un ligero aumento de la densidad de Syp en el área de CA3 en el grupo sobreentrenado comparado con el control de nado. Sin embargo, no se observó alguna diferencia notable en cuanto a la densidad de Syp en el área de GD entre ambos grupos.

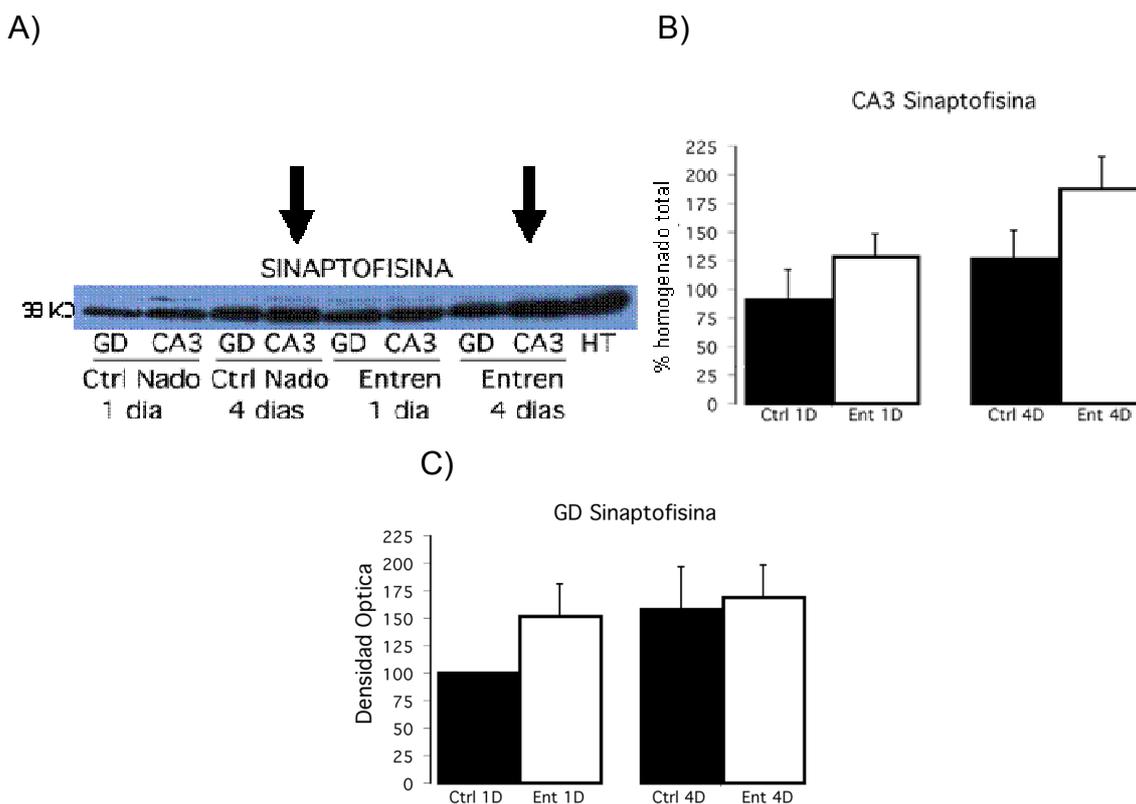


Fig. 7. Cambio en la cantidad de Syp en animales control de nado y sobreentrenados. En A observamos un western blot representativo en donde encontramos una tendencia en el aumento en la cantidad de Syp en GD y CA3 entre los grupos entrenados y controles por 1 y 4 días. En B tenemos el análisis de la densidad óptica de los 2 grupos del área de CA3 por días de entrenamiento o como control. En C tenemos el análisis de la densidad óptica de los 2 grupos del área de GD por días de entrenamiento o como control.

6.5.- Análisis conductual del efecto del bloqueo de los receptores M1 durante adquisición y consolidación de una tarea espacial

En la figura 8 observamos la curva de aprendizaje de los grupos Ringer (n = 19) y Pirenzepina (n = 25) utilizados para cuantificar densidad de Syp. Mediante una ANOVA de medidas repetidas no se encontró diferencia significativa entre los grupos durante los cuatro días de entrenamiento. Sin embargo, durante la prueba de MLP se encontraron diferencias significativas en latencia ($F_{1,11} = 7.248, P < 0.05$), así como en el número de cruces, en donde el grupo Pirenzepina muestra una diferencia significativa en comparación con su control ($F_{1,11} = 16.122, P < 0.01$) (Figura 9).

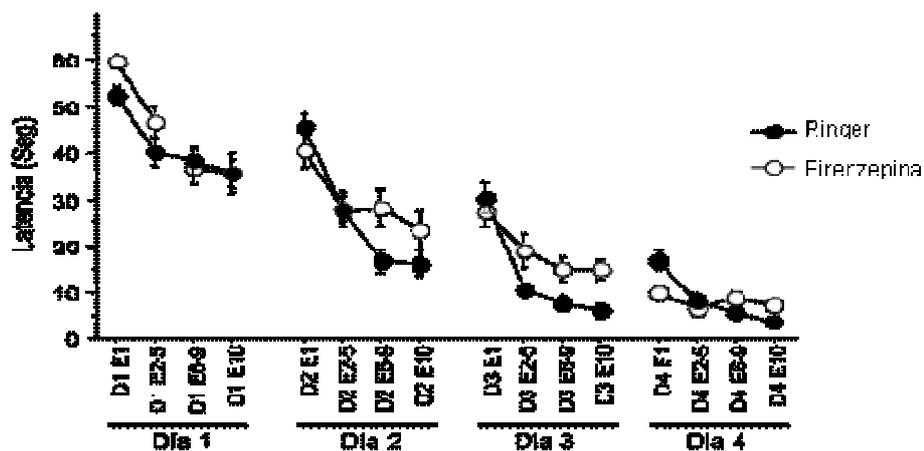
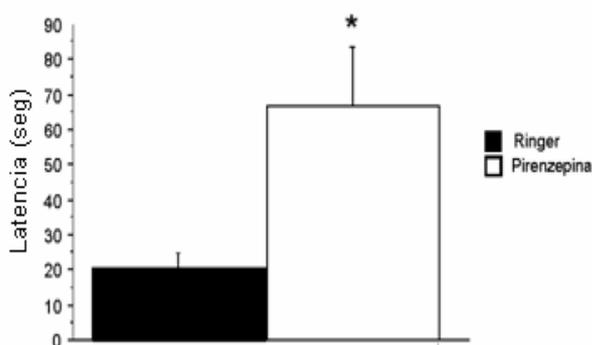


Fig. 8. Curva de aprendizaje de los grupos Ringer y Pirenzepina. Se observa la gran similitud con la que ambos grupos se comportan durante la adquisición de la tarea espacial. En el eje de las X observamos los días de entrenamiento, en cada día se observan cuatro puntos, siendo el primero y el último, el ensayo 1 y 10 respectivamente y los dos puntos intermedios muestran el promedio de los ensayos 2 al 5 y 6 al 9. En el eje de la Y se observa la latencia medida en segundos de cada uno de los ensayos o promedios por día

A)



B)

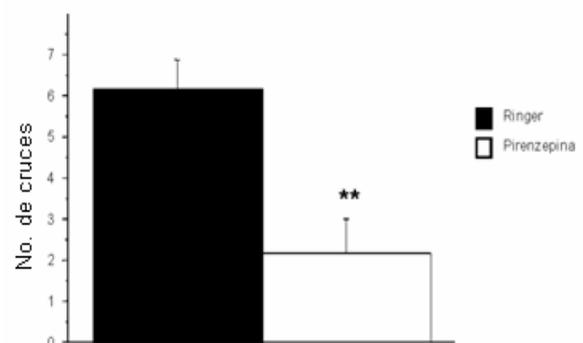


Fig. 9. Efecto del bloqueo de los receptores M1 en la prueba de MLP. En A, se muestra la Latencia medida en segundos en la prueba de MLP para cada grupo. En B se observa el No. de Cruces en la prueba de MLP para los dos grupos. ** = $P < .01$; * = $P < .05$.

Con estos resultados pudimos observar que en ambos experimentos donde se inyectó pirenzepina antes del entrenamiento los animales presentan una adecuada adquisición de la tarea, sin embargo presentan una deficiencia significativa durante la prueba de MLP.

6.6.- Cambio en la expresión de Syp en el área de CA3 mediante la antagonización de los receptores M1 en la adquisición y/o consolidación de una tarea espacial

El análisis de los cinco geles realizados por medio de western blot (Fig. 10), muestra una diferencia significativa en el análisis por medio de una ANOVA factorial ($F_{5,48} = 2.308$, $P < .05$). Tras un post hoc de Fisher observamos una diferencia significativa entre los grupos Ringer de 11 días y Pirenzepina 11 días ($*P < .05$) en este último grupo podemos notar una disminución significativa con respecto al grupo Pirenzepina 4 días en el análisis pos hoc de Fisher ($**P < .001$). Fig 11.



Fig. 10. Imagen representativa de los geles realizados. Los dos grupos experimentales Ringer (Rin) y Pirenzepina (Pirenz) se encuentran divididos por día de entrenamiento.

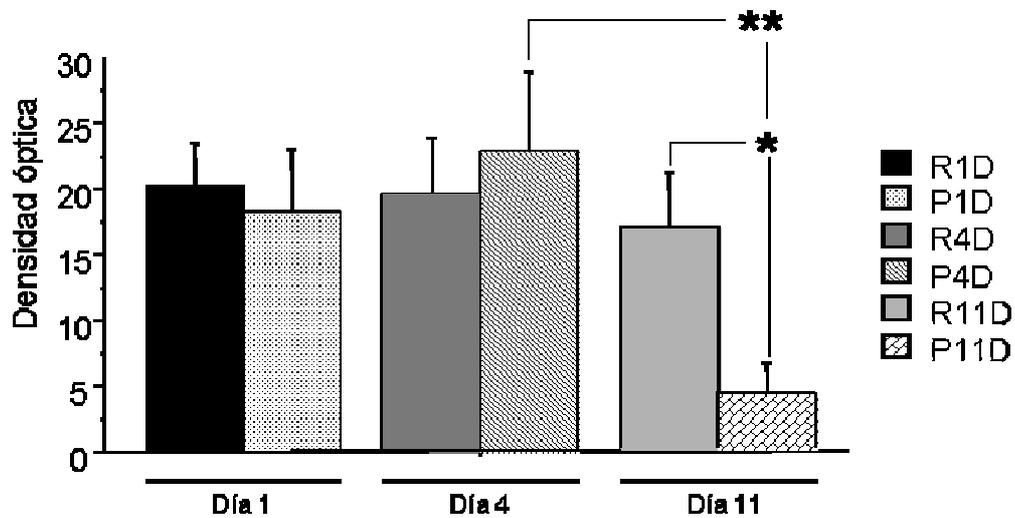


Fig. 11. Análisis de densidades ópticas .La densidad óptica de los geles (n=4) muestran una diferencia significativa entre los grupos Ringer 11 días y Pirenzepina 11 días (*P = .05).

El análisis de la densidad óptica no muestra diferencia significativa entre los grupos pertenecientes al grupo Ringer , (1día, 4días y 11 días). Mientras que en el análisis entre los 3 grupos de Pirenzepina encontramos una diferencia significativa ($F_{2,24}=4.330$, $P < .05$) y en el análisis post hoc de Fisher se encontró una diferencia entre el grupo Pirenzepina 1día y Pirenzepina 11 días (* $P<.05$) y entre los grupos Pirenzepina 4 días y Pirenzepina 11 días (** $P<.001$) en donde observamos una disminución en la expresión de Syp en este último grupo. Fig 12.

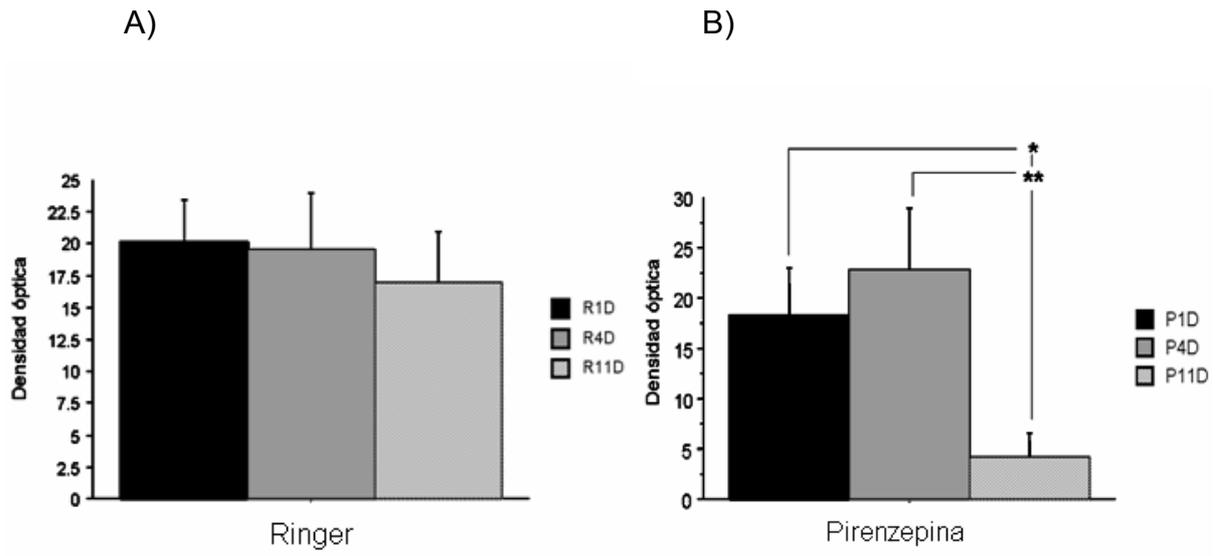


Fig. 12. Densidad óptica por grupo experimental. En la figura A, no encontramos diferencias significativas entre los tres grupos de Ringer. En B, observamos una expresión de sinaptofisina significativamente menor en el grupo de Pirenzepina 11 días con respecto a los grupos 1 y 4 días.

VII. DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que el bloqueo de los receptores muscarínicos post-sinápticos M1 con pirenzepina, en la subregión de CA3 del hipocampo daña la consolidación de una tarea espacial pero sorprendentemente, no daña la adquisición de dicha tarea a pesar de que la ventana de tiempo de participación de los mAChR's es durante la adquisición. Por otra parte, la inyección en esta misma área con 4-DAMP, antagonista selectivo de mAChR's postsinápticos M3, no produjo efecto alguno en la adquisición de la tarea espacial ni en su consolidación. Además, confirmamos mediante la técnica de western blot los datos obtenidos por Ramírez-Amaya, et., al. (1999, 2001), es decir, un incremento en la sinápsis en CA3 como consecuencia de un sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris. De esta manera y mediante esta técnica también encontramos una expresión significativamente menor de sinaptofisina en los animales sobreentrenados bajo el efecto de pirenzepina y que presentaron un déficit significativo en la consolidación de dicha tarea con respecto a su grupo control, esto sugiere la participación de estos receptores M1 como moduladores de la MLP. Los resultados mostrados en este trabajo sustentan la hipótesis de la participación primordial de los receptores M1 en la consolidación de una memoria espacial, y de su posible relación con la sinaptogénesis del área CA3.

La región hipocampal de CA3 es esencial para el procesamiento de la memoria espacial y específicamente en la consolidación de la información espacial (Florian et al., 2004). Esta región se ubica en una posición estratégica pues recibe información sensorial vía externa e interna de dos principales aferencias; las fibras musgosas y la vía perforante (Amaral et al., 1989; 1995), lo que sugiere que el tratamiento de la información recibida para la consolidación de una memoria espacial ocurre al menos en parte en esta subregión del hipocampo (Florian et al., 2004). Se sabe que el aprendizaje induce el incremento de liberación de ACh en el hipocampo y se ha sugerido fuertemente que dichos incrementos de liberación están relacionados directamente con la consolidación de la memoria (Power, et al., 2003). El incremento en la liberación de ACh inducido durante la adquisición persiste al

menos durante 15 minutos después del término de la tarea (Kopf et al., 2001; Miranda & Bermúdez-Rattoni, 1999; Orsetti et al., 1996; Ragozzino et al., 1996). Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan la idea de la participación de la región CA3 del hipocampo como modulador de la consolidación de una memoria espacial y que tal modulación podría estar mediada por los receptores muscarínicos post-sinápticos M1.

Por otra parte, se sabe que el antagonista clásico no selectivo de receptores muscarínicos escopolamina, cuando es administrado sistémicamente, produce amnesia en adquisición y/o consolidación de muchas pruebas conductuales, sugiriendo la participación del sistema colinérgico mediado por sus receptores muscarínicos en procesos nemónicos (Izquierdo, 1989; Caufield et al., 1998). La formación hipocampal posee una gran densidad de receptores M1 en sus células piramidales, granulares e interneuronas (Rouse and Levey, 1997), así como también una distribución preferencial en áreas del cerebro en donde se modula el almacenamiento de la memoria, en estructuras como amígdala, hipocampo, corteza cerebral y neocórtex (Levey, et al., 1991). La inyección sistémica e intrahipocámpica de antagonistas selectivos de este tipo de receptor se ha observado que produce un déficit en la consolidación de tareas como prevención pasiva (Ferreira, et al., 2003; Roldán, et al., 1997). Anagnostaras et al. (2003) encuentran que ratones knockout para receptores M1 presentan un daño en la formación de LTP, en la consolidación de tareas como Non-matching-to-sample y discriminación social, trabajos como estos apoyan la idea de la participación crítica del receptor M1 en funciones nemónicas.

En este trabajo, el déficit en la consolidación (MLP), pero no durante la adquisición de una tarea espacial por la antagonización de los receptores M1, se refleja en la expresión significativamente menor de syp, proteína marcadora de densidades sinápticas sugerentemente funcionales; probablemente debido al déficit de la sináptogénesis observada en esta estructura durante el sobreentrenamiento en el laberinto acuático de Morris, debido al bloqueo de receptores muscarínicos M1. Nuestro trabajo, así como los de Ramírez-Amaya, et al., 1999; 2001, no son los únicos casos de plasticidad sináptica en

hipocampo, diversos investigadores han mostrado una correlación entre el incremento de la densidad sináptica de CA3 y la hiperexcitabilidad inducida en la LTP (Van der Zee et al., 1995; Escobar et al., 1997). Ramírez-Amaya, et al., 2001 encuentran que el incremento de densidad sináptica en CA3 por sobreentrenamiento y el desempeño durante la prueba de memoria a largo plazo tienen una correlación positiva; sugiriendo una relación funcional entre la sinaptogénesis y la formación de la memoria espacial a largo plazo. Se piensa que el sistema de fibras musgosas modula la actividad de las células del área de CA3 en donde su plasticidad permite la codificación de la información (McClelland and Goddard, 1996). De acuerdo con esta idea Mizumori et al., 1999 propone que la contribución de la subregión hilar de CA3 es comparar el contexto espacial esperado con el que es experimentado, apoyando la idea de que la plasticidad sináptica en las proyecciones de las FM hacia CA3 puede estar relacionada con el almacenamiento de representaciones espaciales (McNaughton and Morris 1987; McClelland and Goddard, 1996). Lo anterior concuerda perfectamente con nuestros resultados y con la propuesta de Florian, et al., 2004 de la participación primordial del área de CA3 en el proceso de consolidación de una tarea espacial.

Con base en lo anterior se sugiere una participación del receptor M1 como uno de los principales moduladores del proceso de consolidación de una memoria espacial en el área de CA3 y también en la formación o mantenimiento de la densidad sináptica en esta región y su funcionalidad. Nosotros estudiamos la expresión de syp, la cual es una proteína presente virtualmente en toda terminal pre-sináptica; esta proteína ha sido utilizada en numerosos estudios neuropatológicos como marcador sináptico (Voigt, et al., 1993; Bredy, et al., 2004). La inferencia de que la abundancia de syp refleja densidad sináptica, parece ser garantizada por lo menos como una aproximación (Davies, et al., 2003; Ulupinar and Yucel, 2005). En cualquier evento, una variación cuantitativa en la expresión de syp puede tener un rango de consecuencias sobre la funcionalidad sináptica entre las cuales se pueden encontrar la densidad sináptica, actividad dependiente de la formación de sinápsis, liberación de neurotransmisor y endocitosis vesicular (Eastwood, et al., 2006; Alder, et al., 1992; 1995)

Existe evidencia que correlaciona el aumento del aprendizaje dependiente de hipocampo con el aumento de la distribución de fibras musgosas del brazo inferior de la formación hipocampal (Crucio and Scheweler, 1987; Schopke et al., 1991). En estudios de cultivos de rebanadas hipocampales De Paola, et al., 2003, observan que subpoblaciones de terminales presinápticas de FM aparecen y desaparecen en un lapso de horas, indicando un alto grado de maleabilidad. Holagan, et al., 2006 sugieren que la distribución diferencial de FM en las dendritas basales de CA3 contribuyen en parte al aumento de habilidades cognitivas. Se han reportado hallazgos de los niveles elevados de ACh durante el periodo de consolidación temprano en una gran variedad de investigaciones así como su relación con plasticidad sináptica (Power, et al., 2003). En el hipocampo, la activación de receptores muscarínicos facilita la inducción (Burgard and Sarvey, 1990) y aumento de la magnitud (Blitzer and Landau, 1990) de la potenciación de largo plazo, la forma de plasticidad neuronal más estudiada y que se piensa puede ser la base de la formación de la memoria (Bliss and Collingridge, 1993). La activación muscarínica por sí misma puede producir un incremento de larga duración en el potencial excitatorio post-sináptico y la amplitud de dendritas, como un tipo de plasticidad en términos de LTP muscarínico (Auerbach & Segal, 1994). Todos estos trabajos, así como el conocimiento de que la estructura hipocampal posee una alta plasticidad sináptica y el sistema colinérgico tiene un papel importante en tal plasticidad; apoyan fuertemente los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en donde tras el bloqueo de receptores muscarínicos M1 durante la adquisición se observó un déficit en la expresión de syp en la región de CA3 en aquellos individuos que presentaron un déficit significativo en la consolidación de la tarea; arrojando estos datos una fuerte sugerencia de la modulación directa de este receptor sobre la plasticidad sináptica en el área de CA3 del hipocampo observada durante la consolidación de una memoria espacial.

Una aproximación al entendimiento de la participación moduladora del receptor M1 en consolidación y plasticidad sináptica sería que, en la post-sinápsis una de las interacciones más interesantes entre diferentes

neurotransmisores es probablemente la relación entre la actividad de glutamato y ACh, por eso los eventos plásticos celulares iniciales vía receptores de glutamato tipo NMDA que activan un número de cinasas en las células post-sinápticas (Woolf, 1996). Esta interacción es notablemente crítica en memoria (Woolf, 1998). Los receptores M1 se colocan con los receptores tipo NMDA en las neuronas piramidales del hipocampo y su coactivación con los receptores NMDA resulta en una amplificación de las corrientes de estos últimos receptores (Marino et al., 1998). Además los receptores M1 también son requeridos para la activación muscarínica de cinasas como PKC la cual ha sido altamente implicada en memoria y aprendizaje dependiente de hipocampo entre otras (Van der Zee, 1999). Una de las características de la activación de los receptores muscarínicos es la activación de cinasas reguladas extracelularmente (ERK 1 / 2), las cuales han sido ligadas de diversas formas con la plasticidad sináptica (Orban, Chapman, and Brambilla, 1999) incluyendo LTP (English and Sweatt, 1997).

En resumen, esta tesis sustenta la hipótesis de la participación de los receptores muscarínicos en la región CA3 del hipocampo durante el aprendizaje espacial, siendo los receptores postsinápticos M1, pero no M3, los que se encuentran involucrados en la consolidación de esta memoria a largo plazo. Además, en este trabajo se encontró una relación entre el déficit conductual en la consolidación de la tarea, provocado por el bloqueo de receptores M1 y la menor expresión de sinaptofisina en el área CA3 del hipocampo.

VIII. CONCLUSIÓN

En esta tesis se ha mostrado que la participación de los receptores muscarínicos (M1 y M3) durante la consolidación de una memoria espacial es diferencial; encontrando un déficit significativo durante la prueba de MLP en el laberinto acuático de Morris en el grupo en que se antagonizó M1, sin embargo este efecto no se encontró en el grupo que se antagonizó M3. Siendo estos resultados congruentes con lo encontrado por diversos investigadores en otras tareas conductuales sobre la participación de los receptores muscarínicos, en específico los post-sinápticos. En otra serie de experimentos hemos demostrado que la antagonización de los receptores muscarínicos post-sinápticos M1, tiene un efecto sobre el cambio en la expresión de sinaptofisina tras la consolidación de una memoria espacial; debido sugerentemente a la participación moduladora de este receptor M1 en la consolidación de la memoria espacial y por lo tanto con la posible funcionalidad de la sinaptogénesis observada en esta área (doble banda), la cual se cree podría estar relacionada con la MLP. Sugerencia que concuerda con la idea de la participación del receptor M1 de manera individual o en conjunto con receptores tipo NMDA en la plasticidad sináptica.

REFERENCIAS

1. Alder J, Xie ZP, Valtorta F, Greengard P, Poo MM. 1992. Antibodies to synaptophysin interfere with transmitter secretion at neuromuscular synapses. *Neuron* 9 : 759 – 768.
2. Alder J, Kanki H, Valtorta F, Greengard P, Poo MM. 1995. Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *J Neurosci* 15 : 511- 519.
3. Amaral, DG, Witter, MP. Hippocampal formation, In Paxinos G. ed. The rat nervous system. New York: *Academy Press* 1995;443-493
4. Amaral, DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: review of anatomical data. *Neuroscience* 1989; 31: 571 – 91.
5. Anagnostaras, SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnema NP, Nathanson NM, Silva AJ (2003) Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 Muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 6: 51 – 58.
6. Auerbach J, and Segal M. (1994). A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 72, 2034 – 2040.
7. Bailey CH, Giustetto M, Huang YY, Hawkins R, Kandel ER. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? *Nat Rev Neurosci* 2000; 1: 11 – 20.

8. Bear, MF. 1996. A synaptic basis for memory storage in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13453 – 13459.
9. Bermúdez-Rattoni F, Escobar M. Neurobiology of learning. In Pawlik K, Rosenzweig MR, eds. *International handbook of psychology*. London: Sage Publications; 2000. p. 87 – 109.
10. Bermúdez-Rattoni, F y Roberto A. Prado Alcalá. 2001. *Memoria. Dónde reside y cómo se forma*. Ed. Trillas.
11. Bliss T, Collingridge G. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the rat hippocampus *Nature* 361, 31 – 39.
12. Blitzer R, and Landau, E. (1990). Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*. 119, 207 – 210.
13. Blokland A (1996) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Rev* 21: 285 – 300.
14. Bredy TW, Zhang TY, Grant RJ, Diorio J, Meaney MJ. 2004. peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *Eur J Neurosci* 20: 1355 – 1362.
15. Buresova, O., Bolhuis, J. J. and Bures J., Differential effects of cholinergic blockade on performance of rats in water tank navigation task and in radial maze. *Behav. Neurosci.*, 100 (1986) 476 – 482.

16. Burgard E and Sarvey, J. (1990). Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus. *Neurosci Letters* 116, 34 – 39.
17. Carli, M., Luschi, R., and Samanin, R. (1997). Dose-related impairment of spatial learning by intrahippocampal scopolamine: Antagonism by ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist. *Behavioural Brain Research*, 82, 185 – 194.
18. Caufield, M. P., Higgins, G. A. and Strugghen, D. W., Central administration of muscarinic receptor subtype-selective antagonist pirenzepina selectively impairs passive avoidance learning in the mouse, *J. Pharm, Pharmacol.*, 35 (1983) 131 – 132.
19. Caufield, MP and Birdsall, NJM (1998) Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50 : 279 – 290.
20. Crusio WE, Schwegler H. 1987. Hippocampal mossy fiber distribution covaries with open-field habituation in the mouse. *Behave Brain Res* 26: 153 – 158.
21. Darnaudery, M., Koehl, M., Piazza, P. V., Le Moal, M. and Mayo, W. (2000). Pregnenolone sulfate increases hippocampal acetylcholine release and spatial recognition. *Brain Research*, 852, 173 – 179.
22. Davies HA, Kelly A, Dhanrajan TM, Lynch MA, Rodriguez JJ, Steward MG. 2003. Synaptophysin immunogold labeling of synapses decreases in dentate gyrus of the hippocampus of aged rats. *Brain Research* 986 : 191 – 195.

23. Davis, H. P. and Squire, L. R. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96, 518 – 559(1984).
24. De Paola V, Arbe S, Caroni P. 2003. AMPA receptors regulate dynamic equilibrium of presynaptic terminals in mature hippocampal networks. *Nat Neurosci* 6 : 491 – 500.
25. Degroot, A., and Parent, M. B. (2000). Increasing acetylcholine levels in the hippocampus or entorhinal cortex reverses the impairing effects of septal GABA receptor activation on spontaneous alternation. *Learning and Memory*, 7, 293 – 302.
26. Dudai, Y. 1989. Some basic notions and their ontogenesis. In: *The neurobiology of memory: concepts, findings, trends*. Chao 1, pp 3-18. New York: Oxford UP.
27. Durkin, T. P. (1992). GABAergic mediation of indirect transsynaptic control over basal and spatial memory testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic activity in mice. *Behavioural Brain Research*, 50, 155 – 165.
28. Eastwood MS, CS Weickert, MJ Webster, MM Herman, JE Kleinman and PJ Harrison. Synaptophysin protein and mRNA Expression in the Human Hippocampal Formation From Birth to Old Age. *Hippocampus* 16: 000-000 (2006).
29. English JD and Sweatt JD. (1997). A requirement for mitogen-activated, protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *Letters to Nature* 417, (13), 19103 – 19106.

30. Escobar ML, Barea-Rodríguez EJ, Derrick BE, Reyes JA, Martínez JL Jr. 1997. Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res* 751: 330-335.
31. Evans, G.:J. O. and M.A. Cousin. Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling. *Biochemical Society Transaction* (2005) Vol. 33, part. 6: 1350 – 1353.
32. Fadda, F. Cocco, S. and Stancampiano, R. 2000. Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuro Report* 11: 2265 – 2269.
33. Ferreira, A. R., Lucas Fürstenau, Calos Blanco, Edgar Kornisiuk, Gonzalo Sánchez, Doriana Daroit, Mariane Castro e Silva, Carlos Cerveñasky, Diana Jerusalinsky and Jorge, A. Quillfeldt. Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 74 (2003) 411 – 415.
34. Fibiger, H. C., Cholinergic mechanisms in learning memory and dementia: a review of recent evidence, *Trends Neurosci.*, 14 (1991) 220 – 223.
35. Fisahn A, Yamada M, Duttaroy A, Gan JW, Deng CX, Machain CJ, Wess J (2002) Muscarinic induction of hippocampal gamma oscillations requires coupling of the M1 receptor to two mixed cation currents. *Neuron* 33: 615 – 624.
36. Florian, C., and Pascal Roulet. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research* 154 (2004) 365 – 374.

37. Gold, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 80 (2003) 194 – 210.
38. Golob EJ, Taube JS. Head direction cells and episodic spatial information in rats without a hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:7645 – 50.
39. Hagan, J. J. and Morris, R.G.M. The cholinergic hypothesis of memory: a review of animal experiments. In S. Snyder, L.L. Iversen and S. D. Iversen and S.D. Iversen (Eds.) *The handbook of Psychopharmacology*, Vol. 6, Plenum Press, New York, 1987, pp. 237 – 323.
40. Hebb D.O. The organization of behavior. New York: Wiley; 1949.
41. Herrera-Morales, W., Ivonne Mar, Barbara Serrano and Federico Bermúdez-Rattoni. Activation of hippocampal postsynaptic muscarinic receptors mediates consolidation of spatial memory formation. *European Journal of Neuroscience*. En prensa
42. Holahan MR, Rekart JL, Sandoval J and Routtenberg A. Spatial learning induces presynaptic structural remodeling in the hippocampal mossy fiber system of two rat strains. *Hippocampus* 16 : 560 – 570 (2006).
43. Hollup SA, Kjelstrup KG, Hoff J, Moser M-B, Moser EI. Impaired recognition of the goal location during spatial navigation in rats with hippocampal lesion. *J Neurosci* 2001; 21: 4505 – 13.
44. Hooge R. And Peter P. de Deyn. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36 (2001) 60 – 90.

45. Izquierdo, I. mechanism of amnesic action of scopolamine. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10 : 175 – 7.
46. James, W., The principles of Psychology, Holt Rinehart and Winston, Nueva York, 1890.
47. Johnson, E M., Ueda, T., Maeno, H. and Greengard, P. 1972. Adenosine 3', 5'- monophosphate-dependent phosphorylation of specific protein in synaptic membrana fractions from rat cerebrum. *J. Biol. Chem.* 247, 5650 – 5652.
48. Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030 – 1038 (2001).
49. Kanus, P., Maequeze – Pouey, B. Scherer, H. (1990) *Neuron* 5, 453 – 462.
50. Kopf, S., Buchholzer, M., Hilgert, M., Loffelholz, K., and Klein, J. (2001). Glucose plus choline improves passive avoidance behavior and increases hippocampal acetylcholine release in mice. *Neuroscience*, 103, 365 – 371.
51. Lamprecht, Raphael and Joseph LeDoux. Structural Plasticity and Memory. *Nature Reviews Neuroscience* January 2004 Volume 5.
52. Levey, A. I, Kitt, C. A, Simonds, W.F., Price, D. L. And Brann, M. R., identifcation and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype specific-antibodies, *J. Neurosci.*, 11 (1991) 3218 – 3226.
53. Marino MJ, Rouse ST, Levey AI, Potter LT, Conn PJ. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-

aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 : 11465 – 70.

54. McClelland JL, Goddard NH (1996) Considerations arising from a complementary learning systems perspective on hippocampus and neocortex. *Hippocampus* 6: 654 – 665.

55. McNamara, R. K. and Ronald W. Skelton. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris Water Maze. *Brain Research Reviews*, 18 (1993) 33 – 49.

56. McNaughton N, Morris RG. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. *Trends Neurosci* 1987; 10 : 408 – 15.

57. Messer, W. S. Jr., Bohnett, M. and Stibbe, J. Evidence for a preferential involvement of M1 muscarinic receptors in representational memory, *Neurosci. Lett.* 116 (1990) 184 – 189.

58. Mesulam, M-M. Mufson, E. J., Levey, A. I. and Wainer, B. H. 1983. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: Cytochemistry and cortical connections of (substantia innominata) and hypothalamus in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.*, 214 : 170 – 197.

59. Miranda, M. I., and Bermúdez Rattoni, F. (1999). Reversible inactivation of nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 96, 6478 – 6482.

60. Mizumori SJ, Ragozzino KE, Cooper BG, Leutgeb S. Hippocampal representational organization and spatial context. *Hippocampus*. 1999; 9(4):444-51.
61. Mongeau, R., P. Blier, and C. de Montigny. 1996. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects and antidepressant treatments. *Brain Research Reviews* 23(1997) 145 – 195.
62. Morris R.G., Frey U. 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience. *Philos Trans R soc Lond B Biol Sci*. Oct 29; 352 (1360): 1489 – 503.
63. Morrison C.D. , Prayson R.A. 2000. Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system. *Semin Diagn Pathol* 17: 204 – 215.
64. Nicoll RA, Malenka RC, Coger JA (1990) Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 70: 513 – 565.
65. Niquet J, Jorquera I, Faissner A, Ben-Ari Y, Represa A. 1995. Gliosis and axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with and increase of tenascin-C immunoreactivity. *J Neurocytol* 24: 611-624.
66. Ogren, S. O., Kehr, J., and Schott, P. A. (1996). Effects of ventral hippocampal galanin on spatial learning and on in vivo acetylcholine release in the rat. *Neuroscience*, 75, 1127 – 1140.

67. Ohno, M., Amamoto, T. and Watanabe, S., Blockade of hippocampal M1 muscarinic receptors impairs working memory performance of rats, *Brain research*, 650 (1994) 260 – 266.
68. O'Keefe J, Nadel, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford:Clarendon Press; 1978.
69. Orban PC, Chapman PF, and Brambilla R. (1999) Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term formation? *Trends in neuroscience*, 22, 38 – 44.
70. Orsetti, M., Casamenti, F., and Pepeu, G. (1996). Enhanced acetylcholine release in the hippocampus and cortex during acquisition of an operant behavior. *Brain Research*, 724, 89 – 96.
71. Paxinos, G. and C. Watson. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academia Press, San Diego.
72. Pfenninger, K., Akert, K., Moor, H. and Sandri, C. 1972. The fine structure of freeze – fractured presynaptic membranes. *J. Neurocytol.* 1, 129 – 149.
73. Power, Ann E., Almira Vazdarjanova, and James L. McGaugh. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 80 (2003) 178 – 193.
74. Prado-Alcalá, R.A., Fernández-Ruíz, . and Quirarte, G.L., Cholinergic neurons and memory. In T. W. Stone (Ed.), *Aspects of Synaptic Transmission 2: Acetylcholine, Sigma Receptors, CCK and Eicosanoids, Neurotoxins*, Taylor and Francis Ltd., London, 1993, pp. 59 – 71.

75. Ragozzino, M. E., and Gold, P. E. (1995). Glucose injections into the medial septum reverse the effects of intraseptal morphine infusions on hippocampal acetylcholine output and memory. *Neuroscience*, 68, 981 – 988.
76. Ragozzino, M., Unick, K., and Gold, P. (1996). Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: Augmentation by glucose. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 93, 4693 – 4698.
77. Ragozzino, M. E., Pal, S. N., Unick, K., Stefani, M. R., and Gold, P. E. (1998). Modulation of hippocampal acetylcholine release and of memory by intrahippocampal glucose injections. *Journal of Neuroscience*, 18, 1595 – 1601.
78. Rahamimoff, R., DeRiemer, S. A., Sakmann, B., Stadler, H., and Yakir, N. (1988). Ion channels in synaptic vesicles from Torpedo electric organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5310 – 5914.
79. Ramírez-Amaya, Israela Balderas, Jimena Sandoval, Martha L, Escobar y Federico Bermúdez-Rattoni. Spatial Long Term memory is related to Mossy Fiber Synaptogenesis. *J. Neurosci.* September 15, 2001, 21 (18): 7340 – 7348.
80. Ramírez-Amaya, Martha L. Escobar, Chao, Vincent and Federico Bermúdez- Ratttoni. Synaptogenesis on Mossy Fiber Induced by Spatial Water Maze Overtraining. *Hippocampus* 9 : 631 – 636 (1999)
81. Ramos, J. M. J. ¿Es necesario el hipocampo para el aprendizaje espacial? *Rev. Eurol* 2002; 34 (12): 1142 – 1151.

82. Riedel G, Micheau J. Introduction: molecular mechanisms of memory formation – from receptor activation to synaptic changes. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 521 – 4.
83. Riegel, G., Reymann, K.G. 1996. Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. *Acta Physiol Scand* May; 157 (1): 1 – 19.
84. Rodríguez-Puertas R, Pascual J, Vilaró T, Pazos Á (1997) Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. *Synapse* 26: 341 – 350.
85. Roldán, G., E. Bolaños-Baldillo, H. González-Sánchez, G. Quitarte and R. Prado-Alcalá. Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience letters* 230 (1997) 93 – 96.
86. Rouse St, Levey Al. Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesion: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* 1997; 380 : 382 – 94.
87. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TVP, Stewart MG. 1997. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 80:69 – 77.
88. Sala, M., Braidà, D., Calcaterra, P., Leone, M.P., Comotti, F. A., Pianola, S. and Gori, E. Effect of centrally administered atropine and pirenzepine on radial arm maze performance in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 194 (1991) 45 – 49.

89. Schopke R, Wolfer DP, Lipp HP, Leisinger-Trigona MC. 1991. Swimming navigational and structural variations of the infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of the mouse. *Hippocampus* 1 : 315 – 328.
90. Sharp PE. Subicular cells generate similar spatial firing patterns in two geometrical and visually distinctive environments: comparisons with hippocampal place cells. *Behav Brain Res* 1997; 85:71 – 92.
91. Shimoshige Y, Maeda T, Kaneko S, Akaike A, Satoh M (1997) Involvement of M2 receptor in an enhancement of long-term potentiation by carbachol in Schaffer collateral-CA1 synapses of hippocampal slices. *Neurosci Res* 27: 175 – 180.
92. Shinoe, Toru, Minori Matsui, Makoto M. Taketo and Toshiya Manabe. 2005. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic Acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *The Journal of Neuroscience* . 25 (48): 11194 – 11200.
93. Squire L R. *Memory and Brain* . New York: Oxford University; 1987.
94. Squire, L and Stuart Zola. Structure and function of declarative and non declarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13515 – 13522.
95. Südhof, T. C. 1989. Synaptic vesicles. *Curr. Opinions Cell Biol.* 1, 655 – 659.
96. Südhof, Thomas and Reinhard Jahn. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron*, Vol. 6, 665 – 677, May, 1991.

97. Tayebati SK, Amenta F, El-Assouad D, Zaccheo D (2002) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the hippocampus of aged rats. *Mech Ageing Dev* 123: 521 – 528.
98. Tulving, E., “How many memory systems are there?”, en *American Psychology*, núm. 40, 1985, pp. 385 – 398.
99. Ulupinar E, Yucel F. 2005. Prenatal stress reduces interneural connectivity in the rat cerebellar granular layer. *Neurotoxicol Teratol* 27 : 475 – 484.
100. Valtorta F, Benfenati F. 1995. Membrane trafficking in nerve terminals. *Adv Pharmacol* 32: 505 – 557.
101. Van der Zee, E. A., Compaan, J.C., Bohus, B, and Luiten, P. G. 1995. Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine spatial and colocalized PKC γ in mouse hippocampus induced by soatiak discrimination learning. *Hippocampus* 5: 349 – 362.
102. Van der Zee, E. A. and P.G. M. Luiten. 1999. Muscarinic Acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdale: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Progress in Neurobiology* Vol.58, pp. 409 – 471.
103. Voigt T; De lima AD, Beckmann M. 1993. Synaptophysin immunohistochemistry reveals inside-out pattern of early synaptogenesis in ferret cerebral cortex. *J Comp Neurol* 330 : 48 – 64.
104. Walworth, N. C., Gound, B., Kabcenell, A. K. and Novisk, P. J. 1989. Mutational analysis of SEC4 suggests a cyclical mechanism for the regulation of vesicular traffic. *EMBO J.* 8, 1685 – 1693.

105. Wei, J., Walon, E.A., Milici, A and Buccafusto, J.J. m1 – m5 Muscarinic receptor distribution in rat CNS by Rt – PCR and HPLC, *J. Neurochem.*, 63 (1994) 815 – 821.
106. Wick, M: R. 2000. Immunohistology of neuroendocrine and neuroesodermal tumors. *Semin Diagn Pathol* 17: 194 – 203.
107. Wiedenmann B. Franke WW. 1985. Identificon and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 chracteristics of presyaptic vesicles. *Cell* 41: 1017 – 1028.
108. Woolf NJ. (1996). The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: A hypothesis. *Neurbiol. Learn. Mem.* 66 : 258 - - 266.
109. Woolf NJ. (1998). A structural basis for memory storage in mammals. *Prog. Neurobiol.* 55: 59 – 77.