



Tesina del Diplomado en Neurociencias

Título: Efecto de la estimulación de la amígdala basolateral sobre la capacidad general de memoria espacial en ratas con lesión de fimbria fórnix

Autor: Lic. Randy Calderón Peña

Tutores: M. Sc. Daymara Mercerón Martínez
Dr. C. William Almaguer Melian

Año 2018

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han realizado numerosos estudios que han intentado promover la recuperación de las funciones nerviosas perdidas tras una lesión. Todos los trabajos realizados parten de la capacidad que presenta el Sistema Nervioso de realizar adecuaciones en su estructura y en su funcionamiento en respuesta a variaciones en el medio externo e interno (Bergado- Rosado y Almaguer-Melian, 2000). A esta propiedad emergente se le conoce como plasticidad neural o neuroplasticidad (Post y Weiss, 1997; Bergado-Rosado y Almaguer- Melian, 2000). Muchos de los estudios que buscan restablecer funciones después de lesiones han utilizado a los factores tróficos como herramientas moleculares moduladoras de la plasticidad neural (Woods *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 1999; Terenghi, 1999;). Otros experimentos recientes demuestran que la estimulación de la amígdala 15 min después del entrenamiento mejora la memoria espacial en animales con lesión de fimbria fórnix (Almaguer-Melián *et al.*, 2005; Mercerón-Martínez *et al.*, 2013). Estos trabajos tienen en cuenta dos factores claves en los procesos de plasticidad neural; la dependencia del tiempo de sus mecanismos y el efecto modulador que ejercen las motivaciones y las emociones sobre ellos. Según Mercerón-Martínez *et al.*, (2013), los animales lesionados a los que se les estimuló la amígdala presentaron una disminución en el periodo de latencia y un aumento en el número de cruces con respecto a los animales lesionados. De igual forma, en los animales lesionados a los que se les estimulo la amígdala, presentaron un aumento en los niveles de proteína de Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo, con respecto a los animales entrenados y lesionados. Además Mercerón *et al.*, (2016) encontraron que la estimulación de la amígdala, también provoca un aumento en la transcripción de este gen en esta estructura. Estudios recientes realizados por Mercerón *et al.*, (2018) demuestran que la estimulación de la amígdala aumenta los niveles de las proteínas GAP-43 (proteína presináptica) y MAP-2 (proteína postsináptica), ambas involucradas en procesos de sinaptogénesis.



Tesina del Diplomado en Neurociencias

Título: Efecto de la estimulación de la amígdala basolateral sobre la capacidad general de memoria espacial en ratas con lesión de fimbria fórnix

Autor: Lic. Randy Calderón Peña

Tutores: M. Sc. Daymara Mercerón Martínez
Dr. C. William Almaguer Melian

Año 2018

Todos estos estudios evidencian los procesos neuroplásticos que promueve la estimulación de la amígdala y con ello sus efectos sobre la recuperación de la memoria espacial en ratas con lesión de fimbria fórnix.

Sin embargo, no se conoce si la estimulación de la amígdala se limita a facilitar la adquisición del trazo de memoria específico de la posición relativa de la plataforma sumergida con respecto a las pistas extra-laberínticas. O si, por el contrario, se trata de que los animales que reciben este tratamiento durante el entrenamiento incrementan su capacidad general de aprendizaje espacial. De manera que puedan incorporar nueva información espacial después de haber recibido este tratamiento.

Hipótesis:

La estimulación de la amígdala basolateral durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris facilita la adquisición de nuevos trazos de memoria espacial en ratas con lesión de fimbria-fórnix.

Objetivo:

Evaluar el efecto de la estimulación de la amígdala basolateral, durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, sobre la capacidad general de adquisición de información espacial en ratas con lesión de fimbria-fórnix.

Aporte teórico:

Contribuye a ampliar el conocimiento sobre los efectos que puede tener la estimulación de la amígdala sobre la recuperación de la memoria espacial.

Aporte práctico: Esta investigación servirá de base a futuras investigaciones clínicas que evalúen el efecto de la estimulación de la amígdala en pacientes con déficit cognitivo.

Novedad y Actualidad:

Por primera vez se evalúa si la estimulación de la amígdala basolateral durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris facilita la adquisición de información espacial en ratas con lesión de fimbria-fórnix.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Neuroplasticidad

Según Konorsky, (1948) a la capacidad de corrección y de autorreforma que presenta el sistema nervioso en su funcionamiento se le conoce como neuroplasticidad. Estas variaciones en su funcionamiento se producen en respuesta a cambios en el medio externo e interno (Bergado Rosado y Almaguer Melian, 2000).

Se pueden diferenciar dos formas de la plasticidad neural: La plasticidad funcional y la plasticidad morfológica o por crecimiento. La plasticidad funcional no es más que la modificación de las capacidades de funcionamiento de las sinapsis existentes, que pueden contribuir a la compensación funcional a expensas de sinapsis poco activas o silentes (Bergado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000).

Dentro de la plasticidad funcional existen mecanismos que conducen a cambios transitorios de la eficacia sináptica. La facilitación y la potenciación postetánica son ejemplos de estas formas efímeras de plasticidad, las cuales dependen de la acumulación residual de Ca^{++} en la terminal presináptica (Kamiya y Zucker, 1994), por lo que su duración está limitada por los mecanismos de tampón que reducen la concentración intracelular de este ion (Rosahl *et al.*, 1993). También dentro de la plasticidad funcional se encuentra la LTP (Bliss y Lomo, 1973)

La plasticidad morfológica incluye la regeneración, la formación de colaterales axónicas, el crecimiento dendrítico, la formación de nuevas sinapsis y la neurogénesis. (Bergado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000).

Fases de la LTP, su relación con el aprendizaje y la memoria.

Bliss y Lomo, (1973) descubrieron que aplicando una estimulación breve y de alta frecuencia a las vías aferentes del hipocampo podrían conducir a un

aumento duradero en la magnitud de la respuesta de las neuronas. A este fenómeno después se le dio el nombre de potenciación a largo plazo.

Desde su descubrimiento, la LTP se vinculó a los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss y Collingridge, 1993). Actualmente se piensa que modificaciones similares a las que sostienen a este fenómeno, participan en la maduración funcional de las sinapsis y en los procesos de remodelación que conducen a la recuperación de funciones perdidas como consecuencia de lesiones o trastornos degenerativos (Bergado-Rosado y Almaguer-Melian, 2000).

De manera similar a la memoria, la LTP tiene 2 fases. Una fase inicial, denominada LTP temprana (E-LTP), que tiene una duración inferior a cuatro horas y una fase tardía (L-LTP), con una duración superior a cuatro horas. La fase temprana de la LTP resulta fundamentalmente en modificaciones covalentes y funcionales de proteínas preexistentes en la sinapsis en el momento de inducirla (Reymann y Frey, 2006). Según Nguyen *et al.*, (1994), el bloqueo de la síntesis de proteínas, bloquea la LTP tardía pero no la LTP temprana. A diferencia de la LTP temprana, la fase tardía de la LTP depende de la síntesis de nuevas proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica (Krug *et al.*, 1984).

Los receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) son los responsables de la transmisión sináptica normal, pues median corrientes de sodio que despolarizan la membrana post-sináptica. Cuando el nivel de despolarización alcanza un valor umbral, en presencia de glutamato, se produce la activación de los receptores post-sinápticos glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Collingridge, 1985), los cuales median la entrada de Ca^{2+} (Pelletier, 1996). El influjo de este ion a través de los receptores del tipo NMDA garantiza el comienzo de la E-LTP. El aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , activa proteínas quinasas que producen modificaciones covalentes y funcionales en las proteínas preexistentes (Lynch, 2004; Reymann y Frey, 2007). Entre las proteínas que son activadas se encuentra la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} - Calmodulina (CaMKII), la proteína quinasa C y la proteína quinasa A. La quinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaM-KII) fosforila a los receptores

AMPA. Aumentando su sensibilidad y favoreciendo la inserción de estos receptores en la membrana postsináptica de la espina dendrítica (Kania et al., 2017).

Luscher y Frerking, (2001) plantean que un aumento en la expresión de receptores AMPA, en la membrana post sináptica es posiblemente el primer requerimiento necesario para la LTP. En los mutantes carentes de estos receptores no se produce la activación de los receptores NMDA (Zamanillo et al., 1999)

La síntesis de nuevas proteínas durante la LTP tardía es activada por la cascada AMPc/PKA (Abel et al., 1997).

El Hipocampo

El hipocampo es una estructura límbica cortical, implicada en algunas formas de memoria (Penfield y Milner, 1958). Este no parece ser el almacén definitivo de contenidos de memoria bien establecidos. Sin embargo, existen evidencias clínicas y experimentales que indican que el hipocampo cumple funciones importantes en la consolidación de esta (Milner et al., 1998). Aunque no se excluye su participación en otras formas de memoria, se conoce que está involucrado tanto en la memoria espacial en roedores como en la memoria explícita en humanos (Shapiro and Eichenbaum, 1999). El hipocampo recibe de la corteza grandes volúmenes de información multimodal, la asocia, la retiene durante el procesamiento, la amplifica, probablemente la compara con la ya existente y contribuye a su consolidación en la corteza cerebral (Holscher, 2003).

Esta estructura cerebral recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales a través de su principal puerta de entrada, la llamada vía perforante originada en la corteza entorrinal. Esta proyección es fundamentalmente glutamatérgica y excitadora. También recibe aferencias subcorticales por medio del sistema de la fimbria-fornix. A través de este sistema ingresan al hipocampo fibras colinérgicas varicosas (con sinapsis al paso) que se originan en el *septum* medial y están presentes en todas las capas del hipocampo, aunque con una frecuencia de uniones sinápticas de

sólo un 7%. Ingresan además aferencias GABAérgicas procedentes de la región septal que contactan sinápticamente con las células hipocampales. También conforman este sistema, pero en menor grado, aferentes dopaminérgicas, que arriban del área tegmental del tronco encefálico; noradrenérgicas provenientes del *locus coeruleus* (15 % de contactos sinápticos) y serotoninérgicas que llegan del rafe medial (21 % de contactos sinápticos). La mayoría de las varicosidades (80-90%) presentes en estas aferencias subcorticales no hacen contactos sinápticos, si no que liberan el transmisor al intersticio (Vizi y Kiss, 1998). De este modo se puede mantener un control tónico en todas las células del hipocampo.

Las tres áreas más conocidas del hipocampo están interconectadas entre sí formando un circuito trisináptico. Estas conexiones permiten el flujo de información a través de las células granulares del giro dentado y las piramidales del Cuerno de Amón (Brown y Zador, 1990). Este circuito se caracteriza por una organización particular de fibras glutamatérgicas excitadoras que presentan la siguiente secuencia sináptica: las sinapsis de las fibras de la vía perforante descargan sobre las células granulares del giro dentado, estas a su vez envían sus axones a la región CA3 donde hacen sinapsis con las neuronas piramidales, las cuales envían colaterales axónicas (colaterales de Schaeffer) hacia la región CA1 para hacer sinapsis allí con las células piramidales de donde se originan las principales proyecciones extrínsecas del hipocampo hacia el *subiculum* y la corteza entorrinal cerrando el lazo córtico-hipocámpal (Taylor and Brown, 1999). En el hipocampo el 90 % de las neuronas son glutamatérgicas y el otro 10 % GABAérgicas (Freund and Buzsáki, 1996).

6 Amígdala. Relaciones con la memoria

La amígdala es una estructura límbica, conformada por varios núcleos, que presenta múltiples conexiones recíprocas con otras estructuras límbicas y con la corteza (Maren, 1996). Se ha demostrado que la amígdala está relacionada con los procesos de memoria emocional (LeDoux, 1993), y que pudiera actuar

reforzando contenidos de memoria en otras zonas del cerebro (McGaugh, 2002).

Existen evidencias que los factores estresantes del comportamiento deterioran la LTP, por tanto era de esperar que la activación de la amígdala, la cual media algunos aspectos del estrés, también perjudicara la LTP. Sin embargo, los estudios de Akirav y Richter-Levin, (1999) y los de Abe, (2001) demuestran como la estimulación de la amígdala favorece este proceso y con ello la memoria.

Además de estas evidencias electrofisiológicas que explican como la amígdala modula el almacenamiento de memoria en el hipocampo. También existen trabajos que muestran la relación anatómica de estas estructuras. Las proyecciones más generalizadas de la amígdala al hipocampo se originan en el núcleo basal y se proyectan sustancialmente hacia la corteza entorrinal (CE), CA3, CA1, el subículum y el parasubículum. La CE y el parasubículum luego proyectan a la DG. El núcleo basal accesorio se proyecta sustancialmente a la CE, a CA1 y el parasubículum. Mientras que las principales proyecciones del núcleo lateral son dirigidas a la CE y al parasubículum (Pikkarainen et al., 1999).

La estimulación de la amígdala ha sido utilizada en trabajos que intentan recuperar funciones perdidas tras una lesión. Un ejemplo de ello lo constituyen los estudios realizados por Mercerón-Martínez *et al.*, (2013). Estos autores evidencian que a los animales con lesión de fimbria fórnix a los que se les estimuló la amígdala presentaron una disminución en el periodo de latencia y un aumento en el número de cruces, en el laberinto acuático de Morris, con respecto a los animales lesionados.

La estimulación de la amígdala desencadena mecanismos neuroplásticos. La estimulación de esta estructura aumenta los niveles de BDNF en el hipocampo (Mercerón-Martínez *et al.*, 2013) y la transcripción de este gen (Merceron *et al.*, 2016). Además, la estimulación de esta estructura aumenta los niveles de

GAP-43 y MAP-2, proteína presináptica y postsináptica respectivamente. Ambas, involucradas en procesos de sinaptogénesis (Mercerón *et al.*, 2018)

Fimbria Fórnix, efectos de la lesión.

La fimbria fórnix constituye el mayor tracto aferente y eferente que conecta el hipocampo con el diencefalo, el cerebro anterior, el estriado y la corteza prefrontal (Cassel *et al.*, 1997). Esta provee al giro dentado y el cuerno de Amón de inervación aminérgica y colinérgica procedente del septo y los núcleos de la formación reticular del tronco encefálico (Cassel *et al.*, 1997, Vizi y Kiss, 1998).

La lesión de esta aferencia provoca defectos de memoria similares a los de la lesión del mismo hipocampo (Almaguer-Melian *et al.*, 1999). El daño de esta estructura ocasiona serios daños en el aprendizaje y en la memoria espacial, sin recuperación espontánea apreciable, al menos hasta doce semanas después de producida la lesión (Almaguer-Melian *et al.*, 2003).

Además, esta lesión también afecta la LTP (Buzsáki y Gage, 1989; Bergado *et al.*, 1996). Sin embargo, este sistema parece intervenir más en la consolidación de la LTP que en su inducción. La lesión de la FF afecta a la consolidación de los cambios neuroplásticos y, con ello, a la retención del contenido de la memoria. Estas aferencias median los efectos de estructuras subcorticales relacionadas con las emociones y el estado motivacional que prolongan la LTP (Seidenbecher *et al.*, 1995).

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales de experimentación

Se emplearán ratas machos Wistar (250–300 g) provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los animales se mantendrán en el vivario del Centro Internacional de Restauración Neurológica bajo condiciones de temperatura y humedad controladas (23 °C, 50% de humedad relativa), así como respetando los ciclos de luz y oscuridad (12 h). Además tendrán acceso a comida y agua *ad libitum*.

3.2. Lesión de fimbria-fórnix

Una semana después del acondicionamiento de los animales en el vivario se llevarán al salón de cirugía donde serán anestesiados con una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral, en una dosis de 420 mg/kg de peso. Posteriormente, los animales serán ubicados en un marco estereotáctico, fijados por las barras auditivas y la pinza nasal. La piel será limpiada con una solución antiséptica y separada mediante un corte longitudinal a lo largo del eje medial para exponer el cráneo. Tomando como referencia el punto Bregma se realizarán dos ventanas bilateralmente, según las coordenadas del Atlas de rata de Paxinos (Paxinos y Watson, 1998): antero-posterior (AP= -1.4 mm) y medial-lateral (ML=±0.5-±3.1). La lesión de la FF se realizará bilateralmente con un bisturí rebajado 11 que fue montado en la torre en un ángulo de 15° respecto a la vertical en las coordenadas antero-posterior (AP= -1.4 mm) y media-lateral (ML= 0.8), punto a partir del cual se descenderá lentamente hasta una profundidad de 5.0 mm respecto a Bregma. Luego la cuchilla se desplazará lateralmente 3.1 mm donde se mantendrá por un espacio de 5 min antes de proceder a su extracción. En el hemisferio contrario se aplicará el mismo procedimiento. Finalmente se suturará la piel y se aplicará Nitrofurazona sobre las heridas.

3.3. Prueba conductual en el Laberinto acuático de Morris

El Laberinto acuático de Morris consiste en una piscina circular de 1.50 m de diámetro donde el agua se encuentra a una temperatura de 22°C. Está marcado con puntos virtuales equidistantes denominados norte(N), sur(S), este (E) y oeste(O) respectivamente. Una semana después del procedimiento quirúrgico los animales serán entrenados durante cuatro días sucesivos en el

laberinto acuático de Morris para evaluarles la memoria de referencia. Los animales se colocarán en el agua aleatoriamente desde cada una de las posiciones antes mencionadas y se les dejará explorar 60 s como máximo hasta encontrar la plataforma sumergida. Si transcurrido este tiempo, el animal no ha encontrado la plataforma, será llevado hasta esta y permanecerá en ella por un tiempo de 30 s. Durante los primeros tres días se realizarán ocho intentos consecutivos para cada animal. El cuarto día, primeramente realizarán cuatro intentos e inmediatamente después se les realiza la misma prueba pero sin la plataforma (Prueba de los Cruces), para comprobar que los animales han aprendido el lugar donde se encuentra esta. La próxima semana se les realizará esta prueba pero cambiando la plataforma de posición. Esto nos podrá informar si los animales son capaces de incorporar nueva información espacial.

La conducta seguida por los animales será captada por una cámara digital conectada a una computadora. Los datos serán tomados y procesados usando el programa SMART (Panlab, v 2.0). Se medirán como variables conductuales indicadoras de aprendizaje y memoria: la latencia de escape (en segundos), que es el tiempo que demoran los animales encontrar la plataforma y escapar del agua, y la tigmotaxia (en segundos) que es el tiempo que los animales nadan pegados a las paredes de la piscina. También se medirá la distancia (en centímetros), el tiempo en el cuadrante (en segundos) donde estuvo la plataforma durante la prueba de los cruces, y el número de cruces que hicieron por donde antes estuvo la plataforma.

3.4 Grupos experimentales

Para este estudio se crearán 5 grupos experimentales. El primero será el grupo control (Control*, N=10), formado por animales sanos. Además se creará un grupo de animales lesionados (FF*, N=10), un grupo de animales lesionados más estimulados a los 15 minutos (FF+BLA* 15', N=10), un grupo de animales lesionados más estimulados a las 5 horas (FF+BLA 5h, N=10), para evaluar el efecto de la estimulación de la amígdala fuera de la ventana temporal, y un grupo lesionado con plataforma visible (FF-PV, N=10). Todos estos grupos experimentales serán entrenados durante dos semanas. La segunda semana de entrenamiento se cambiara la plataforma de posición. Esto nos informará si

la estimulación de la amígdala aumenta la capacidad general de memoria espacial en ratas con lesión de fimbria fórnix.

Además se realizaron 3 grupos experimentales para comprobar el dominio de las diferentes técnicas que se emplearan en el estudio. Un grupo control (C,N=7), un grupo de ratas lesionadas (FF, N=7) y un grupo de ratas lesionadas más estimuladas (FF+BLA, N=7). En estos tres grupos el entrenamiento se realizó solamente durante una semana, sin cambiarla de posición.

3.5 Estimulación de la amígdala

Los electrodos serán implantados en la amígdala según los descrito por (Mercerón-Martínez *et al.*, 2013). Cada animal será anestesiado y fijado en un marco esterotáctico (David Kopf, Saint Louis). A cada animal se le realizaran agujeros en el cráneo, los cuales serán abiertos siguiendo coordenadas específicas para el giro dentado y la BLA. Un Electrodo monopolar se insertará en la circunvolución dentada en las coordenadas AP = -3.8 mm; ML = + 2 mm y DV = -3.5 mm (Paxinos & Watson 1998) para registrar los potenciales evocados y otro electrodo monopolar se insertará en la BLA, en las coordenadas AP = -3,1 mm; ML = + 4.7mm y DV = -8.5mm (Paxinos y Watson 1998) para estimular la amígdala. La posición final de los electrodos de estimulación se ajustará mediante la monitorización de los potenciales evocados en la circunvolución dentada después de la estimulación de la BLA, hasta encontrar un potencial monofásico típico de 20 ms latencia y una amplitud mínima de 1 mV. Las ratas pertenecientes al grupo FF+BLA 15', se les aplicará 15 minutos después del entrenamiento 3 x 15 impulsos de 200 Hz, 400 µA, durante los tres primeros días. Mientras que las ratas pertenecientes al grupo FF+BLA 5h, se les aplicara igual procedimiento 5 horas después del entrenamiento.

3.6 Determinación de Cfos

Se aplicó una técnica inmunohistoquímica para determinar los niveles de c-Fos en los diferentes grupos experimentales. Para ello previamente el tejido nervioso fue extraído de cada animal y procesado en el histoquinete para

incluirlo en parafina. Luego fue cortado en un micrótomo de rotación manual a un grosor de 12 μm . Cada lámina se dejó por lo menos durante un período de 24 h en la estufa para su posterior procesamiento. Posteriormente se comenzó con la aplicación de la técnica inmunohistoquímica. Primeramente se procedió a desparafinar cada una de las láminas (xilol I, xilol II, alcohol absoluto, alcohol 90%, alcohol 80%, agua destilada), después se procedió al desenmascaramiento antigénico por calor, para ello las láminas fueron incluidas en buffer citrato a temperatura de 90°C durante 30 minutos. Se dejó que las láminas tomaran temperatura ambiente y se pasó al bloqueo de la peroxidasa. Posteriormente se realizaron 5 lavados con KPBS cada uno durante 3 minutos. Después se aplicó el anticuerpo primario durante 72 horas. Una vez transcurrido este periodo, se realizaron nuevamente 5 lavados con KPBS durante 3 minutos para posteriormente aplicar el anticuerpo secundario. Este anticuerpo fue aplicado en cada corte histológico durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se realizaron lavados con KPBS para posteriormente aplicar el complejo por 30 min y luego realizar el relevado. Entre estos dos últimos pasos también se realizó enjuagues con KPBS.

3.7 Análisis estadístico

Para las variables periodo de latencia y número de cruces se verificó que los datos se ajustaran a una distribución normal y presentaran homogeneidad de varianza. Ambas premisas se cumplieron. Para analizar si existían diferencias en el periodo de latencia entre los diferentes grupos experimentales y entre los días que duró el experimento, se realizó un ANOVA de mediciones repetidas. Mientras que para la variable número de cruces se realizó un ANOVA de clasificación simple, para evaluar si existían diferencias entre los grupos. En caso de encontrar diferencias, se realizó una prueba de comparación de medias a posteriori.

Para el resto de las variables, se verificará el cumplimiento de las premisas de las pruebas paramétricas. En caso de que se cumplan, se aplicarán pruebas, de no ser así se aplicarán pruebas no paramétricas.

4. Resultados parciales

Los animales con lesión de fimbria fórnix presentaron elevados valores en la latencia de escape, sin mostrar variación durante los días que duró el experimento. Sin embargo, en los animales controles esta variable disminuyó durante días consecutivos. En el caso de los animales lesionados a los que se les estimuló la amígdala, presentaron diferencias con respecto al grupo de animales lesionados, notándose una mejoría en el periodo de latencia durante días consecutivos. Aunque se produce una mejoría, esta variable no llega a los valores del grupo control (ANOVA de mediciones repetidas, $F(2,18)= 72.91$, $p<0,05$; prueba de Duncan). (Fig 1a). Con respecto al número de cruces, también se encontraron diferencias entre los tres grupos estudiados (ANOVA de Clasificación simple, $F(2,18)= 68.11$, $p<0,05$; prueba de Duncan). Esta variable disminuyó notablemente entre el grupo control y los dos grupos restantes. El grupo de animales lesionados a los que se les estimuló la amígdala también presentó diferencias con respecto al grupo de animales lesionados. Presentando un ligero incremento en el número de cruces (Fig 1b). Estos resultados evidencian que la estimulación de esta estructura puede tener efecto sobre la recuperación de la memoria espacial.

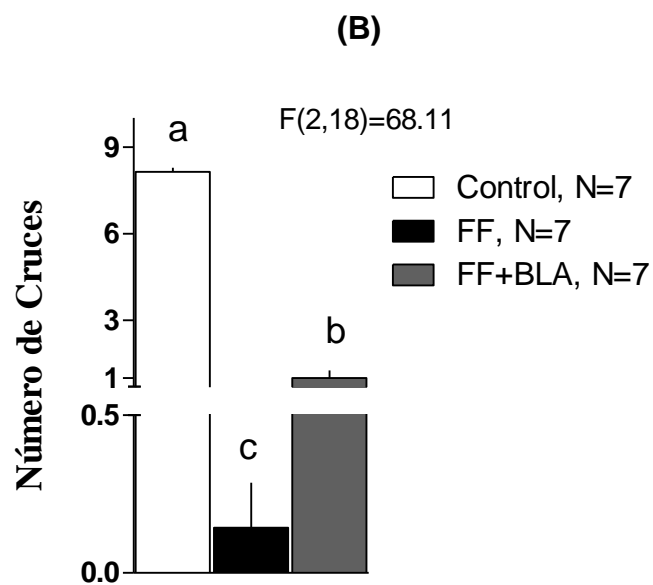
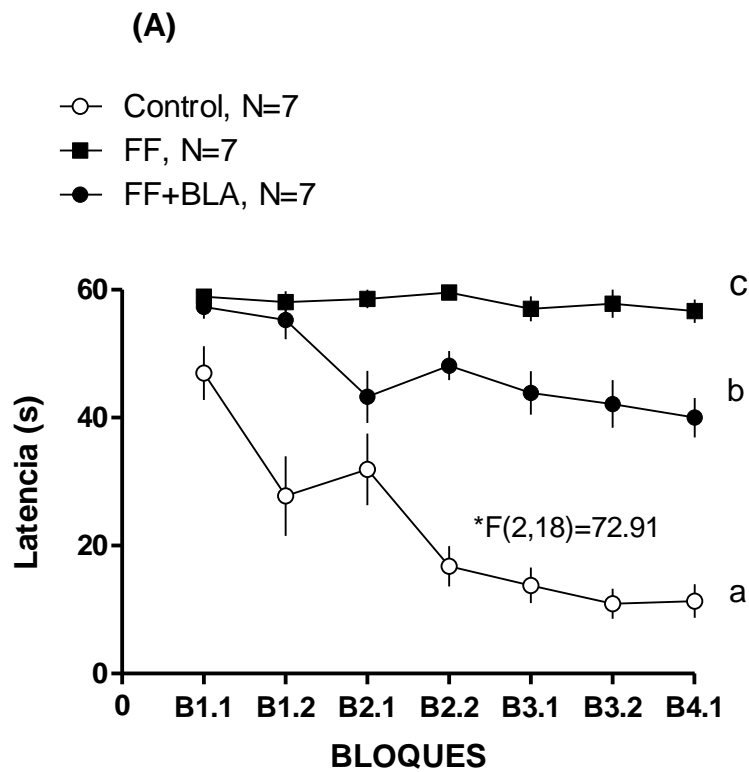


Figura 1. A) Variación en el periodo de latencia durante los días del experimento en animales controles, lesionados (FF) y lesionados más estimulados (FF+BLA). B) Número de cruces en animales controles, lesionados y lesionados más estimulados.

Se encontró un aumento en la expresión de cFos en las ratas a las que se les estimuló la amígdala, tanto en el hipocampo como en la corteza prefrontal (Fig 2).

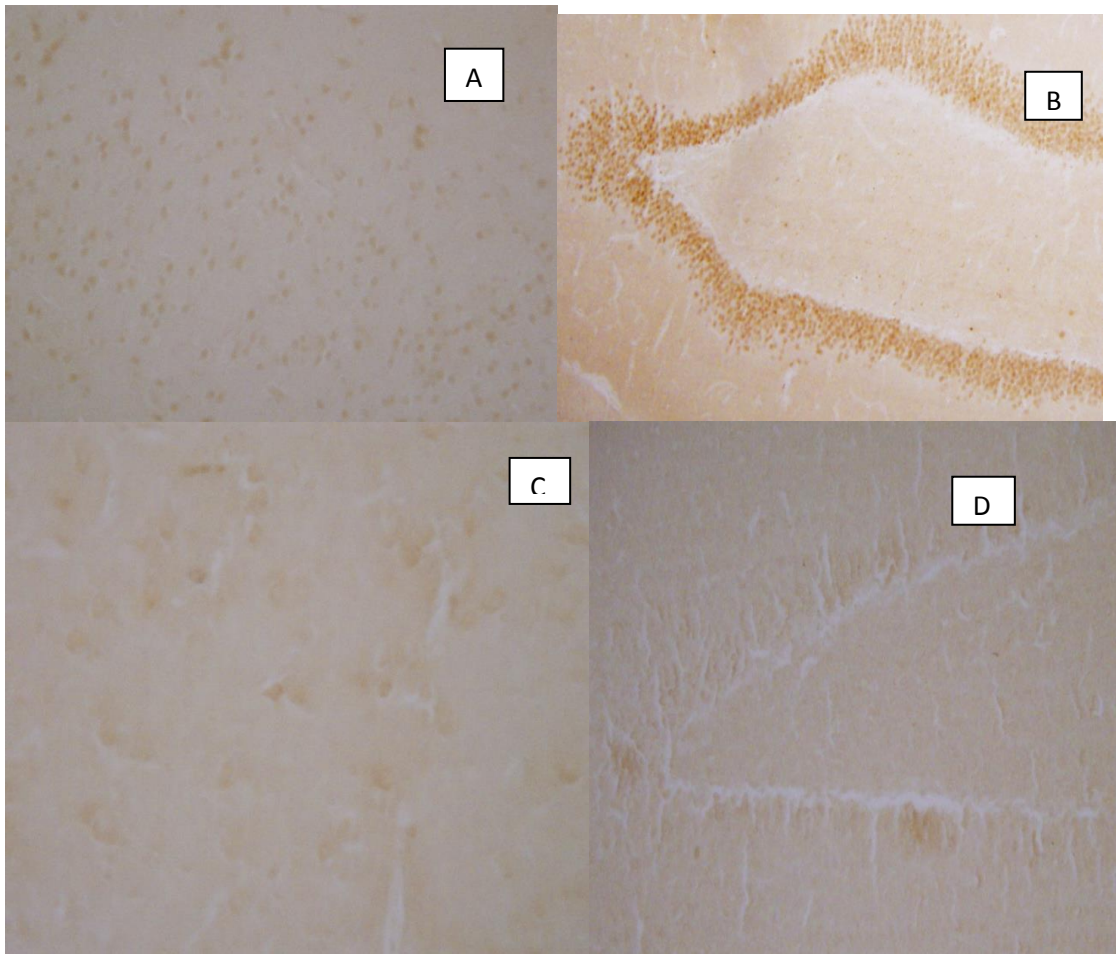


Figura 2. Foto micrografía (20X) de: A) Corteza prefrontal de rata a la que se le estimuló la amígdala B) Hipocampo de rata a la que se le estimuló la amígdala C) corteza prefrontal de rata control D) Hipocampo de rata control.

Conclusiones parciales

Se logró demostrar el dominio de las técnicas que serán empleadas en el resto de los grupos experimentales para darle cumplimiento a los objetivos propuestos.

5. Literatura citada

Abe K. (2001) Modulation of hippocampal long-term potentiation by the amygdala: a synaptic mechanism linking emotion and memory. *Jpn J Pharmacol* 86:18-22.

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TAS, Kandel ER. (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.

Akirav I, Richter-Levin G. (1999) Biphasic modulation of hippocampal plasticity by behavioral stress and basolateral amygdala stimulation in the rat. *J Neurosci* 19:10530-5.

Almaguer-Melian W, JasGarcía J, FrancisTurner L, Antúnez-Potashkina I, Bergado-Rosado J. (1999) Estudio comparativo de la lesión de fimbria-fórnix por aspiración y transección. *Rev Neurol* 29: 704-9.

Almaguer-Melian W, Vallejo A, Ramírez M, Capdevila V, Rosillo JC, Bergado-Rosado JA. (2003) Estudio comparativo de la lesión bilateral de corteza entorrinal y de la fimbria-fórnix. *Rev Neurol* 37:619-622.

Almaguer-Melian W, Capdevila V, Ramirez M, Vallejo A, Rosillo-Marti JC, Bergado-Rosado JA. (2005) Post-training stimulation of the basolateral amygdala improves spatial learning in rats with lesion of the fimbria-fornix. *RestorNeurolNeurosci* 23:43-50.

Bergado-Rosado JA, Almaguer-Melian W. (2000) Mecanismos celulares de la neuroplasticidad. *Rev Neurol* 31:1074-1095.

Bergado JA, Moreno H, Núñez N. (1996) Fimbria-fornix lesion impairs long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat. *Biol Res* 29: 197-202

Bliss TV, Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232:331-356.

Bliss TVP, Collingridge GL. (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Brown TH, Zador AM (1990) The Synaptic organization of the brain

Buzsáki G, Gage FH. (1989) Absence of longterm potentiation in the subcortically efferented dentate gyrus. *Brain Res* 484: 94-101.

Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B. (1997) The fimbria-fornix cingulate bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51: 663-716.

Collingridge GL. (1985) Long term potentiation in the hippocampus: mechanisms of initiation and modulation by neurotransmitters. *Trends in Pharmacological Sciences*.6: 407-411.

Freund TF, Buzsáki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 6:347-470.

Holscher C. (2003) Time, space and hippocampal functions. *Rev Neurosci*.14:253-84

Kamiya H, Zucker RS. (1994) Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603-606.

Kania BF, Wronska D, Zieba D. (2017) Introduction to Neural Plasticity Mechanism. *Journal and behavioral and Brain Science* 7:41-49

Konorsky J. (1948) Excitability and plasticity in the nervous system. In: *Conditioned reflexes and neuron organization* Cambridge: University Press.

Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull*; 13:39-42pp

LeDoux JE. (1993) Emotional memory systems in the brain. *Behav brain Res* 58: 69-79

Luscher C, Frerking M. (2001) Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 24:665-670.

Lynch MA. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.

Maren S. (1996) Synaptic transmission and plasticity in the amygdala: An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13:1–22.

McGaugh, J.L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: A systems perspective. *Trends Neurosci*, 25: 456-461.

Mercerón-Martínez D, Almaguer-Melian W, Serrano Sánchez T, Lorigados L, Pavon N, Bergado- Rosado JA. (2013) Hippocampal neurotrophins after stimulation of the basolateral amygdala, and memory improvement in lesioned rats. *RestorNeuroI Neurosci* 31:189-197.

Milner B, Squire LR, Kandel ER. (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.

Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265:1104-7.

Pelletier MR, Hablitz JJ. (1996) Tetraethylammonium induced synaptic plasticity in rat neocortex. *Cereb Cortex* 6: 771-780.

Penfield W, Milner B (1958) Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *Arch. Neurol. Psychiat.* 79:475-479.

Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen A. (1999) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* 11:229-60.

Post RM, Weiss SR. (1997) Emergent properties of neural systems: how focal molecular neurobiological alterations can affect behavior. *Dev Psychopathol* 9:907-929.

Ramirez JJ, Finklestein SP, Keller J, Abrams W, George MN, Parakh T. (1999) Basic fibroblast growth factor enhances axonal sprouting after cortical injury in rats. *Neuroreport* 10:1201-1204.

Reymann KG, Frey JU. (2006) The late maintenance of hippocampal LTP: Requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology*.

Reymann KG, Frey JU (2007) The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology* 52:24-40.

Rosahl TW, Geppert M, Spillane D, Herz J, Hammer RE, Malenka RC, Südhof TC. (1993) Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 75:661-670.

Shapiro ML, Eichenbaum, H. (1999) Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus* 9:365-384.

Seidenbecher T, Balschun D, Reymann KG.(1995) Drinking after water deprivation prolongs 'unsaturated' LTP in the dentate gyrus of rats. *Physiol Behav* 57: 1001-4.

Taylor P, Brown JH (1999) Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. *Acetylcholine* 6:213-242.

Terenghi G. (1999) Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 194:1-14.

Vizi ES, Kiss JP. (1998) Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interaction. *Hippocampus* 8: 566-607.

Woods AG, Guthrie KM, Kurlawalla MA, Gall CM. (1998) Deafferentation-induced increases in hippocampal insulin-like growth factor-1 messenger RNA expression are severely attenuated in middle aged and aged rats. *Neuroscience* 83:663-668.

Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Koster HJ, Borchardt T, Worley P, Lubke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B. (1999) Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284:1805-1811.