



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS DE LA REGIÓN CA1  
DEL HIPOCAMPO EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA  
DE LARGO PLAZO FACILITADA POR NICOTINA”**

**TESIS**

FACULTAD DE  
QUÍMICA



BIBLIOTECA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**KARLA GEORGINA SALGADO PUGA**

DIRIGIDA POR

**Dr. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PARTICIPACIÓN DE LOS ASTROCITOS DE LA  
REGIÓN CA1 DEL HIPOCAMPO EN LA CONSOLIDACIÓN DE  
LA MEMORIA DE LARGO PLAZO FACILITADA POR NICOTINA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**KARLA GEORGINA SALGADO PUGA**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA**

**SINODALES**

**Dr. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dr. ROBERTO AGUSTÍN PRADO-ALCALÁ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**M. en C. MÓNICA A. LÓPEZ HIDALGO**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. LAURA C. BERÚMEN SEGURA**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**DEDICATORIA.**

A mis dos grandes ejemplos en la vida, mis Padres.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Deseo expresar mi agradecimiento de manera especial el apoyo de las siguientes personas:

cDra. Mónica Andrea López Hidalgo

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso

Sr. Ángel Méndez Olalde

M. en C. Norma Serafín López

M.V.Z. Martín García Servin

A los sinodales por la revisión y sus valiosos comentarios:

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Dra. Laura Cristina Berúmen Segura

A mi tutor:

Dr. José Jesús García Colunga

Asimismo agradezco el apoyo de las siguientes instituciones para la realización del presente trabajo:

Laboratorio de Biología Celular y Molecular II, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM.

Laboratorio de Aprendizaje y Memoria, Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM.

Bioterio, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT IN204809)

CONACyT (81911, 82158).

Facultad de Ciencias Químicas, UAQ.

## ÍNDICE GENERAL.

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Hipocampo	3
II.1.1 Estructura anatómica del hipocampo	3
II.1.2 Conexiones de la región CA1: aferencias y eferencias	4
II.2 Plasticidad sináptica	5
II.2.1 Tipos de plasticidad sináptica: potenciación de largo plazo	5
II.2.2 Mecanismos celulares de la potenciación de largo plazo	6
II.2.3 Potenciación de largo plazo como modelo celular de la memoria de largo plazo	9
II.3 Nicotina	10
II.3.1 Efectos fisiológicos	10
II.3.2 Efectos de la nicotina en el hipocampo	11
II.3.3 Participación de la nicotina en la potenciación de largo plazo	11
II.4 Neuroglía	12
II.4.1 Tipos de neuroglía	12
II.4.2 Astrocitos	13
II.4.2.1 Papel de los astrocitos en la transmisión sináptica	14
II.4.2.2 Participación de los astrocitos en la potenciación de largo plazo	15
II.5 Aprendizaje y memoria	16

II.5.1	Tipos de memoria	17
II.5.2	Formación de la memoria de largo plazo en el hipocampo	18
II.5.3	Participación de la nicotina en la memoria de largo plazo	19
II.5.4	Participación de los astrocitos en la memoria de largo plazo	20
III.	HIPÓTESIS	21
IV.	OBJETIVOS	22
IV.1	General	22
IV.2	Específicos	22
V.	METODOLOGÍA	23
V.1	Materiales	23
V.1.1	Reactivos	23
V.1.2	Equipos	24
V.1.3	Material biológico	24
V.1.4	Cámara de condicionamiento de evitación inhibitoria	25
V.2	Métodos	26
V.2.1	Cirugía	26
V.2.2	Manipulación	26
V.2.3	Administración de fármacos	26
V.2.4	Tarea de evitación inhibitoria	28
V.2.4.1	Sesión de entrenamiento	28
V.2.4.2	Sesión de prueba	29
V.2.5	Histología	29
V.2.6	Análisis estadístico	30
V.3	Diseño experimental	31
V.3.1	Curva intensidad-respuesta	31
V.3.2	Curva dosis-respuesta de nicotina	31
V.3.3	Curva dosis-respuesta de monofluoroacetato	31

V.3.4 Efecto del monofluoroacetato sobre la consolidación de la memoria facilitada por nicotina	31
V.3.5 Efecto de la D-serina sobre la consolidación de la memoria normal y facilitada por nicotina	31
VI. RESULTADOS	32
VI.1 Curva intensidad-respuesta	32
VI.2 Curva dosis-respuesta de nicotina	32
VI.3 Efecto del monofluoroacetato sobre la consolidación de la memoria normal y facilitada por nicotina	32
VI.4 Efecto de la D-serina sobre la consolidación de la memoria normal y facilitada por nicotina	37
VII. DISCUSIÓN	38
VII.1 Participación de los astrocitos en la consolidación de la memoria	38
VII.2 Participación de los astrocitos en la consolidación de la memoria facilitada por nicotina	39
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	51

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro		Página
1	Efecto de los gliotransmisores en la transmisión sináptica	16
2	Farmacocinética de la nicotina	52
3	Propiedades de los nAChRs	55

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Página
1	Estructura anatómica del hipocampo	4
2	Esquema de las principales conexiones aferentes del hipocampo	5
3	Esquema de la LTP producida en la región CA1 del hipocampo	6
4	Esquema del receptor a glutamato NMDA	7
5	Inducción de la LTP depende de los NMDARs	8
6	Esquema del mecanismo celular de la LTP	9
7	Estructura de la (S)-nicotina ( $C_{10}H_{14}N_2$ )	10
8	Subtipos de astrocitos	13
9	Participación de los astrocitos en la sinapsis	15
10	Esquema de la formación de la MLP en función del tiempo	18
11	Vías aferentes y eferentes en la formación de la MLP en el hipocampo	19
12	Equipo utilizado en la tarea de evitación inhibitoria	25
13	Esquema del diseño experimental	27
14	Representación de la sesión de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria	28
15	Representación de la sesión de prueba en la tarea de evitación inhibitoria	29
16	Fotomicrografías de los cortes histológicos	30
17	Curva intensidad-respuesta	33
18	Efecto de la Nic en la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria	34
19	Efecto del MFA en la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria	35
20	Efecto del MFA y la D-ser en la consolidación de la MLP facilitada por nicotina en la tarea de evitación inhibitoria	36
21	Oxidación de la nicotina en (S)-cotinina ( $C_{10}H_{12}N_2O$ )	53
22	Estructura básica de los nAChRs	54

## RESUMEN.

Diversos estudios han mostrado que la nicotina facilita la memoria de largo plazo (MLP). Recientemente se ha descubierto que además de las neuronas, los astrocitos expresan receptores nicotínicos, y responden a la nicotina con la movilización de calcio intracelular y la posible liberación de gliotransmisores. Estos hallazgos sugieren que los astrocitos pudieran estar participando en la facilitación de la MLP producida por la nicotina. El objetivo de esta tesis fue evaluar la participación de los astrocitos, y en particular el gliotransmisor D-serina en la MLP y en la MLP facilitada por nicotina. Para este propósito, se utilizaron ratas macho (Wistar) las cuales fueron entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria. Se les administraron bilateralmente en la región CA1 del hipocampo (solos o en combinación) un inhibidor del metabolismo glial, el MFA y D-serina (40 min. antes del entrenamiento) en presencia y ausencia de nicotina (15 min. antes del entrenamiento s.c.). La evaluación de la MLP se realizó a las 48 h. Los resultados muestran que la aplicación de MFA (10, 20 y 40 mM) en el hipocampo dorsal, tuvo un efecto amnésico, que se revertió en presencia de D-serina (100  $\mu$ M). La facilitación de la MLP producida por la administración de nicotina (0.4 mg/kg), no se observó en presencia de MFA y se restauró por completo cuando se co-administró con D-serina. Nuestros resultados muestran por primera vez que a través de la liberación de D-serina, los astrocitos son elementos esenciales en la MLP normal y facilitada por nicotina.

## I. INTRODUCCIÓN.

El hipocampo es una estructura cerebral que ha sido asociada con los procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria. El aprendizaje se ha definido como el proceso por el cual un organismo adquiere conocimiento acerca de su entorno, mientras que la memoria es el proceso en que el conocimiento es codificado, guardado y posteriormente recuperado.

Para que estos procesos se lleven a cabo es necesario que el sistema nervioso central experimente cambios morfológicos y funcionales (plasticidad sináptica), los cuales le otorgan la capacidad de adquirir, almacenar y recuperar la información. Un tipo de plasticidad sináptica que es considerada como la base celular de los procesos de aprendizaje y memoria es la potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés).

Se ha propuesto que la LTP involucra cambios morfológicos y funcionales únicamente en las neuronas pre y postsinápticas. No obstante, evidencias recientes han mostrado que los astrocitos (un tipo de célula glial), además de detectar la actividad sináptica de las neuronas a través de receptores de neurotransmisores específicos, pueden responder a ella con incrementos de la concentración de calcio intracelular y la subsecuente liberación de gliotransmisores como el glutamato, el ATP y la D-serina. Esta comunicación entre neuronas (pre y postsinápticas) y astrocitos, ha sido denominada como "sinapsis tripartita". De esta manera, los astrocitos participan en la transmisión sináptica y pueden intervenir en diversos tipos de plasticidad sináptica como la LTP. Su participación en estos procesos se ha visto corroborada con hallazgos conductuales en diversas tareas enfocadas al estudio de la formación de la memoria de largo plazo (MLP).

Diversos trabajos han mostrado que la nicotina (Nic) facilita la transmisión sináptica en el hipocampo. Por ejemplo, en estudios conductuales, se ha observado que la administración sistémica o tópica (en la región CA1) de Nic facilita la MLP. Estos hallazgos han sido utilizados para tratar diversas enfermedades neurodegenerativas que afectan los procesos de aprendizaje y memoria como el Alzheimer y la esquizofrenia.

De manera interesante, se ha encontrado que los astrocitos en cultivo de la región CA1 del hipocampo, responden a la aplicación de Nic con incrementos de la concentración de calcio intracelular. Estos hallazgos abren la posibilidad de que los astrocitos pudieran estar participando en los efectos de la Nic sobre la comunicación neuronal y procesos cognitivos superiores, como el aprendizaje y la memoria. En este sentido, el presente trabajo pretende analizar la participación de los astrocitos en la MLP facilitada por Nic. Tenemos claro que el conocimiento de las bases neurobiológicas de los efectos conductuales de la Nic en la MLP, permitirá en el futuro, el desarrollo de nuevos objetivos terapéuticos y farmacológicos encaminados a mejorar los procesos de aprendizaje y memoria en patologías neurodegenerativas que padecen el 35% de la población mayor de 65 años de edad en México.

## II. ANTECEDENTES.

### II.1 Hipocampo.

El hipocampo es una estructura anatómica que junto con el giro dentado, el *subiculum* y la corteza entorrinal, comprenden un sistema funcional llamado formación hipocampal (Figura 1). La función del hipocampo se ha relacionado con diversos procesos cognitivos como el aprendizaje (Moser y col., 1993; Bunsey y Eichenbaum 1996), la memoria declarativa (Eichenbaum, 2001), asociativa (Good y Honey, 1991), y espacial (Gothard y col., 1996), así como la ansiedad (Gray, 1982) y, la regulación del estrés (McEwen y Sapolsky, 1995), entre otros.

#### II.1.1 Estructura anatómica del hipocampo.

El término "hipocampo" (derivado de la palabra griega para caballo de mar) fue acuñado por el anatomista Arantius en 1587, debido a su forma tridimensional en el cerebro humano. Rafael Lorente de Nó, en 1934 dividió al hipocampo en cuatro regiones: CA1, CA2, CA3, y CA4 (CA proviene del nombre *Cornu Ammonis* o el asta de Ammón), cada una con características estructurales y conexiones diferentes que influyen en su función (Andersen y col., 2007).

La capa piramidal, está claramente delimitada y contiene los somas de las células piramidales. A pesar de que se encuentra en todas las regiones es más prominente en CA1 (Figura 1). La capa que envuelve a las neuronas piramidales se denomina estrato *oriens*. Dentro del estrato *oriens*, se encuentra una capa delgada llamada *alveus*, por donde cursan fibras que llegan al hipocampo de otras regiones, y fibras que parten del mismo (estas últimas son los axones de las células piramidales del hipocampo). El estrato radiado está localizado en el asta de Ammón inmediatamente por debajo de las piramidales. En esta capa, se encuentran las conexiones entre los axones de las piramidales de CA3 (colaterales de Schaffer) y las piramidales de CA1. Finalmente, la capa más profunda del hipocampo es el estrato lacunoso-molecular (Figura 1), por donde viajan las fibras de la corteza entorrinal (Andersen y col., 2007).

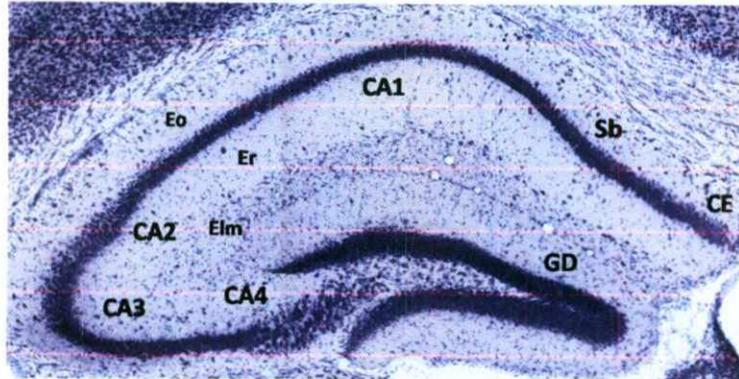


Figura 1. Estructura anatómica del hipocampo. GD, giro dentado; Sb, *subiculum*; CE, corteza entorrinal; Elm, estrato lacunosomolecular; Er, estrato radiado; Eo, estrato *oriens*. Modificado de Paxinos y Watson, 2005.

### II.1.2 Conexiones de la región CA1: aferencias y eferencias.

Para entender la compleja red de conexiones propias del hipocampo, se deben separar las conexiones aferentes, proyecciones de las que recibe información y las conexiones eferentes, proyecciones que salen del hipocampo y que envían la información a otras estructuras cerebrales.

Una de las características distintivas de la conectividad del hipocampo es que la mayoría de las entradas sinápticas provienen de él mismo. Es decir, el hipocampo, tiene una conectividad unidireccional, teniendo como entrada la corteza entorrinal que forma conexiones con el giro dentado y las neuronas piramidales de la región CA3 por la vía perforante (Figura 2). Las neuronas de la región CA3 también reciben información del giro dentado por la vía de las fibras musgosas (Figura 2). Éstas mandan axones hacia las neuronas piramidales de la región CA1 por la vía de las colaterales de Schaffer, así como a células de CA1 en el hipocampo contra lateral por la vía comisural asociativa (Figura 2). Las neuronas de la región CA1 también reciben información directamente de la vía perforante y manda axones hacia el *subiculum*. Estas neuronas a su vez, mandan la información hacia la corteza entorrinal formando un bucle (Andersen y col., 2007). Además de las aferencias intrahipocámpicas, la región CA1 está ricamente inervada por fibras colinérgicas y dopaminérgicas (Kandel, 1991). La salida del circuito hipocámpico es a través de la región CA1, cuyas eferencias se extienden hasta el bulbo olfatorio,

las cortezas visual e insular, con ramificaciones dispersas en las regiones temporal, occipital, parietal y prefrontal (Cenquizca y Swanson, 2007).

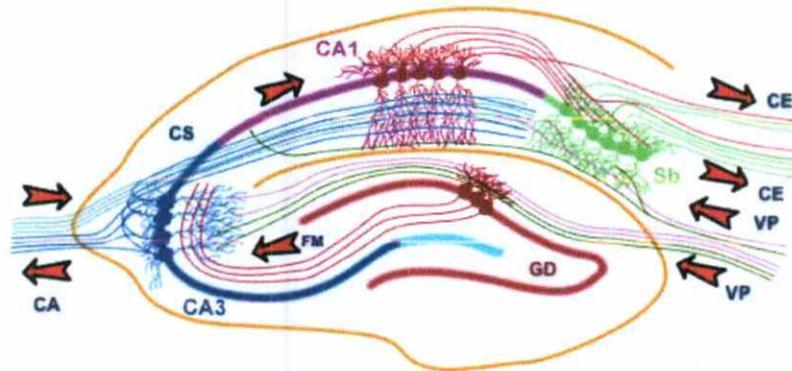


Figura 2. Esquema de las principales conexiones aferentes del hipocampo. CS, colaterales de Schaffer; FM, fibras musgosas; CA, comisural asociativo; CE, corteza entorrinal; VP, vía perforante; Sb, *subiculum*. Modificado de Wang y Storm, 2005.

## II.2 Plasticidad sináptica.

El concepto de plasticidad sináptica se ha desarrollado principalmente en estudios relacionados con el aprendizaje y la memoria. Los cambios (de duración variable) en la función sináptica son denominados plasticidad neuronal (Rebolledo, 2002). Los eventos plásticos pueden incluir cambios en la estructura, distribución y número de sinapsis, y se ha sugerido que estos cambios morfológicos y funcionales subyacen a la formación de la memoria de largo plazo -MLP- (Bear, 1996). El hipocampo es una estructura particularmente plástica, en donde los cambios morfológicos tales como la sinaptogénesis (generación de nuevas sinapsis) y neurogénesis (generación de nuevas neuronas) ocurren, incluso en el cerebro adulto (Ramírez-Amaya y col., 2001).

### II.2.1 Tipos de plasticidad sináptica: potenciación de largo plazo.

Dentro de los procesos de plasticidad sináptica se incluyen: habituación, deshabituación, sensibilización, facilitación y potenciación de largo plazo (LTP), entre otros. Esta última fue descubierta por Bliss y Lomo (1973) en el giro dentado del conejo y posteriormente descrita para la región CA3 y CA1 (Alger y Teyler,

1976). Brevemente, la estimulación eléctrica de alta frecuencia de las colaterales de Schaffer produce un incremento en las respuestas postsinápticas de las neuronas piramidales en CA1 que se mantiene por varias horas (Figura 3).

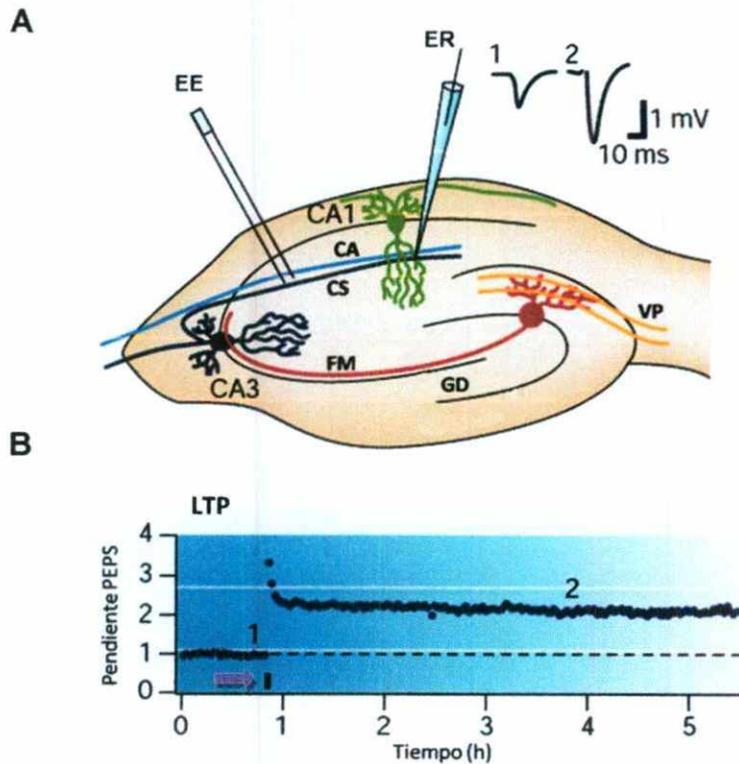


Figura 3. Esquema de la LTP producida en la región CA1 del hipocampo. A, se muestra la localización de los electrodos de estimulación (EE) y de registro (ER) y los cambios en la amplitud del PEPS (potencial excitatorio postsináptico) antes (1) y durante (2) la LTP. B, cambios en la pendiente de los PEPS producidos por la estimulación de alta frecuencia (flecha) a través del tiempo. CA, comisural asociativo; CS, colaterales de Schaffer; VP, vía perforante; FM, fibras musgosas; GD, giro dentado; LTP, potenciación de largo plazo. Modificado de Collingridge y col., 2004.

### II.2.2 Mecanismos celulares de la potenciación de largo plazo.

La LTP resulta de la actividad coincidente de los elementos pre y postsinápticos generando una facilitación de la transmisión química que puede durar por horas, días, semanas y hasta meses (Abraham y col., 2002). La LTP tiene otras características muy importantes como la cooperatividad, especificidad y la asociatividad. En particular, la propiedad asociativa depende de la coincidencia de

la actividad pre y postsináptica. En la mayoría de las sinapsis glutamatérgicas en el SNC, los subtipos de receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDARs) cumplen esta función (Cooke y Bliss, 2006).

Los NMDARs son canales iónicos que pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos los cuales son permeables a sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y principalmente a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Estos canales son buenos para detectar la coincidencia en la actividad pre y postsináptica debido a que su activación requiere de dos eventos: 1) la despolarización de la célula postsináptica y 2) la presencia del co-agonista (glicina o D-serina -D-ser-) del NMDAR (Figura 4).

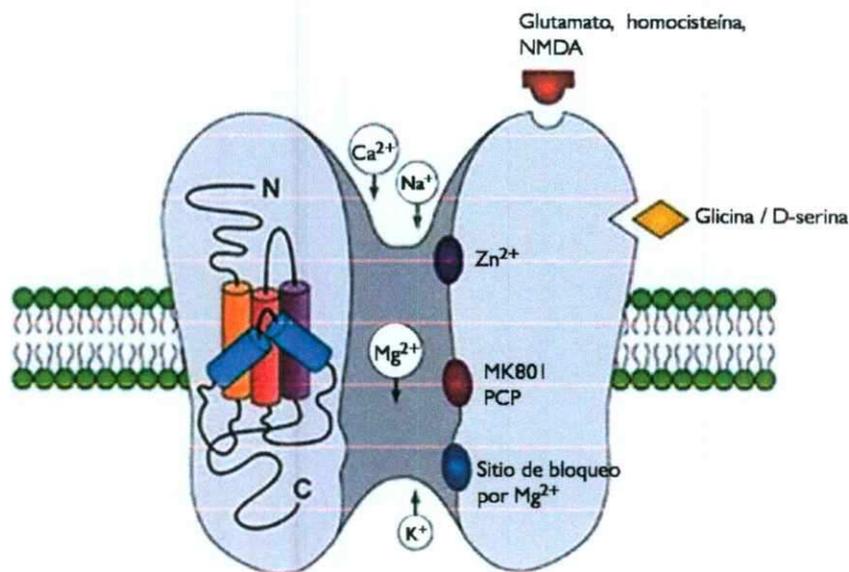


Figura 4. Esquema del receptor a glutamato NMDA. Se muestran los sitios de unión al agonista (glutamato, homocisteína y NMDA), a co-agonistas (glicina y D-serina), así como los iones entrantes y salientes. NMDA, N-metil-D-aspartato;  $\text{Na}^+$ , sodio;  $\text{K}^+$ , potasio;  $\text{Ca}^{2+}$ , calcio;  $\text{Zn}^{2+}$ , zinc;  $\text{Mg}^{2+}$ , magnesio, MK801, (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] ciclohepteno-5,10-imina maleato; PCP, feniclidina. Modificado de Smith, 2002.

En la sinapsis, el glutamato liberado por la neurona presináptica se une a los NMDARs y a los receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA). Sin embargo, los NMDARs, no se abren debido a que en estas condiciones se encuentran bloqueados por magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Los AMPARs son

permeables a  $\text{Na}^+$  y su activación produce un potencial excitatorio postsináptico (Figura 5A). Una vez que la célula postsináptica se despolariza lo suficiente, los iones de  $\text{Mg}^{2+}$  desbloquean el canal (Figura 5B), permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los NMDARs (Lynch, 2004; Cooke y Bliss, 2006). El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  activa, por un lado, la vía dependiente de la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) y por otra, la vía de la adenosina monofosfato cíclica -cAMP- (Figura 6). Ambas vías conllevan a la fosforilación de receptores, aumento de receptores, activación de factores de transcripción, entre otras (Alberini y col., 1995).

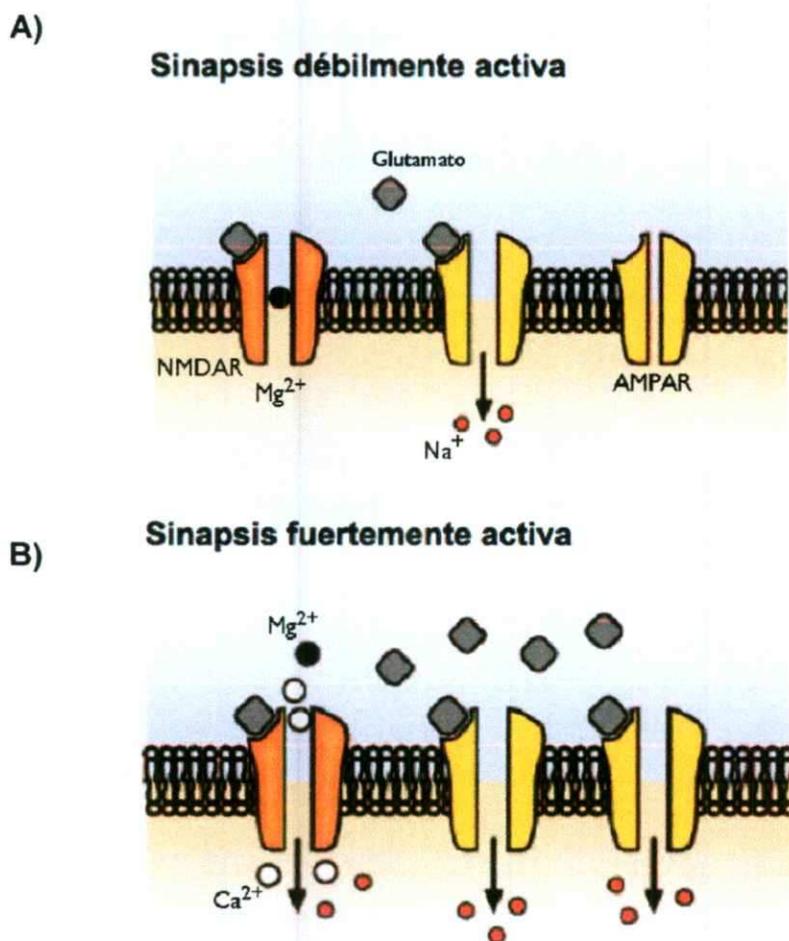


Figura 5. Inducción de la LTP depende de los NMDARs. Nótese que la activación de los NMDARs necesita de la activación de los AMPAR. A) muestra la activación de la sinapsis antes de la LTP. B) muestra la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los NMDARs durante la LTP. Modificado de Cooke y Bliss, 2006.

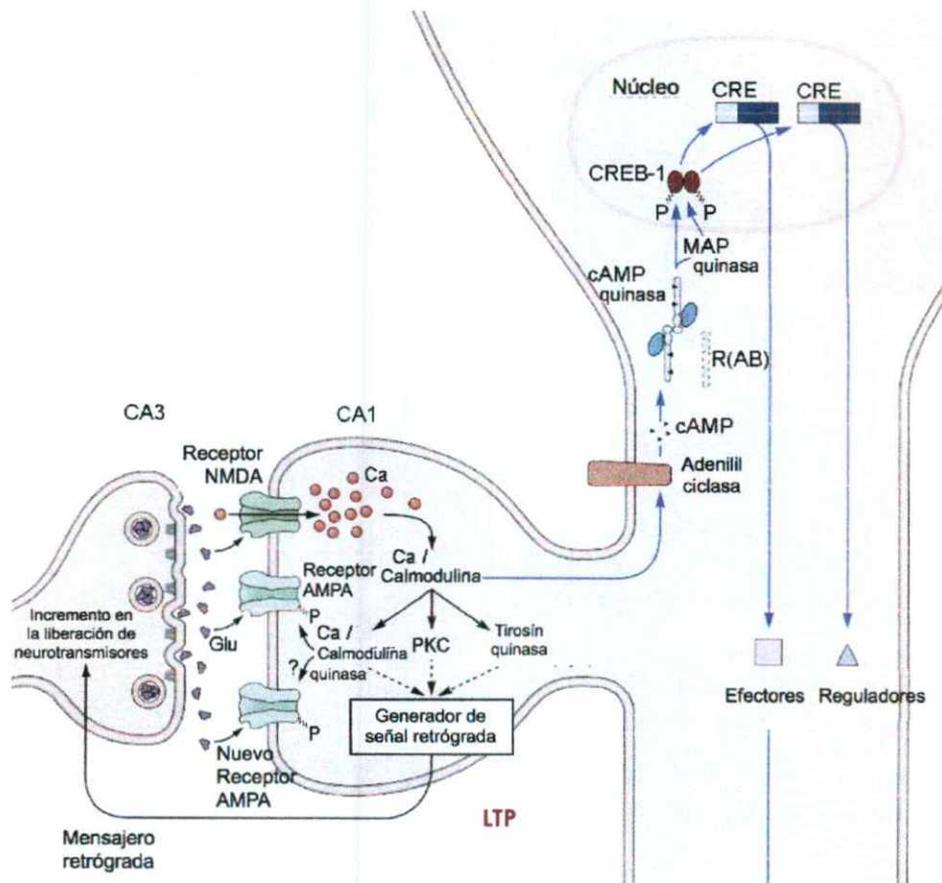


Figura 6. Esquema del mecanismo celular de la LTP. El aumento de la eficiencia sináptica en las neuronas glutamatérgicas está determinado, por un lado por el incremento en la liberación de neurotransmisores y por otro, en el número y función de los receptores postsinápticos. Glu, glutamato; Ca, calcio; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; P, sitios de fosforilación; CRE, elemento de respuesta al cAMP; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP; AMPA, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; NMDA, N-metil-D-aspartato; PKC, proteína quinasa C. Modificado de Kandel, 1991.

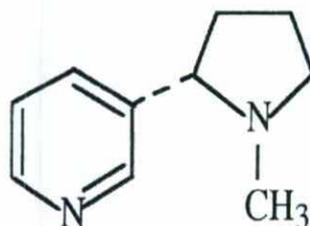
### II.2.3 Potenciación de largo plazo como modelo celular de la memoria de largo plazo.

Actualmente, existe una gran cantidad de evidencia que muestra que la LTP y la memoria son llevados a cabo por mecanismos moleculares similares. En este sentido, las modificaciones celulares que se observan al inducirse la LTP (estructura, distribución y número de sinapsis, el incremento de receptores postsinápticos de glutamato, etc.) también se han observado en los procesos de aprendizaje y memoria (Borroni y col., 2000), en específico en la tarea de evitación

inhibitoria en la región CA1 del hipocampo (Taubenfeld y col., 2001). Además, se ha demostrado que la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria inducen la LTP en el hipocampo (Whitlock y col., 2006). Por último, la inhibición del establecimiento de la LTP en el hipocampo también bloquea el aprendizaje y la memoria en pruebas conductuales (Pastalkova y col., 2006). En este sentido, Morris y col. (1986) mostraron que en presencia del ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico -AP5- (inhibidor selectivo de los NMDARs) la inducción de la LTP *in vivo* se disminuía, así como el aprendizaje y la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático. Del mismo modo, mutaciones en los NMDARs de la región CA1 del hipocampo inhiben la inducción de la LTP, así como la formación de la memoria espacial (Tsien y col., 1996).

### II.3 Nicotina.

La nicotina (Nic) es un alcaloide natural (Figura 7) que se encuentra en la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*). Constituye aproximadamente de 0.6 - 3.0% del peso seco y su función en la planta es la de insecticida (Hukkanen, 2005). Ver anexo I.



**(S)-Nicotina**

Figura 7. Estructura de la (S)-nicotina (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>). Nombre IUPAC, 3-[(2S)-1-metilpirrolidin-2-il] piridina. Modificado de Hukkanen y col., 2005.

#### II.3.1 Efectos fisiológicos.

La administración de Nic puede facilitar la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, epinefrina, serotonina, glutamato, entre otros (Dani y Bertrand, 2007), lo que implica la activación de diversos sistemas. Por ejemplo, la

liberación de dopamina activa los sistemas de recompensa, por lo que se piensa es un mecanismo que favorece la adicción a la Nic (Pidoplichko y col., 2004; Kenny y Markou, 2006). De igual manera, la liberación de glucosa del hígado y de epinefrina de la médula adrenal tiene un efecto estimulante que posteriormente causa un efecto de relajación (Lagrue y col., 2001).

La administración de Nic a pacientes con Alzheimer, Parkinson y esquizofrenia mejora diversas funciones cognitivas como la atención, la información espacial, el aprendizaje y la memoria (Newhouse y col., 1996; Smith y col., 2002). En particular, la administración crónica de Nic a pacientes con Alzheimer disminuye la acumulación de placas  $\beta$ -amiloide en el hipocampo (Liu y col., 2007).

### II.3.2 Efecto de la nicotina en el hipocampo.

Una vez que llega al cerebro, la Nic se une a los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico (nAChRs, por sus siglas en inglés). En particular, los nAChRs más expresados en el hipocampo son los  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ , y  $\alpha 7$  (Zoli y col., 1998; Fabian-Fine y col., 2001). Los receptores  $\alpha 7$  son altamente permeables a  $Ca^{2+}$ , mientras que los  $\alpha 4\beta 2$  son mayormente permeables a  $Na^+$  y  $K^+$ . Estos últimos presentan una mayor afinidad a la Nic (Andersen y col., 2007). Estos receptores se localizan en las neuronas presinápticas tanto en los axones como en los somas; y en las neuronas postsinápticas, principalmente en las dendritas (Zarei y col., 1999).

En el hipocampo, la activación de los nAChRs puede tener efectos tanto excitadores como inhibidores. Estos efectos dependerán de la localización y de la actividad de los nAChRs, así como de factores alostéricos y el grado de desensibilización (Ji y col., 2001). De esta manera, los receptores presinápticos pueden aumentar la probabilidad de la liberación de los neurotransmisores. Mientras que los receptores postsinápticos producen una despolarización y un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Andersen y col., 2007).

### II.3.3 Participación de la nicotina en la potenciación de largo plazo.

La activación de los nAChRs por Nic u otros agonistas, participan en procesos fundamentales de la plasticidad sináptica como la LTP (Ji y col., 2001). En este

sentido, se ha mostrado que el tratamiento agudo o crónico con Nic (Fujii y col., 1999) activa los receptores  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$  presentes en las piramidales e interneuronas de la región CA1 del hipocampo facilitando con esto la inducción de la LTP (Fujii y col., 2000; Yamazaki y col., 2005). Incluso, Le Magueresse y col. (2007) mostraron que aún en ausencia de estimulación eléctrica la Nic es capaz de inducir la LTP.

#### II.4 Neuroglía.

El sistema nervioso central (SNC) está compuesto de diversas poblaciones celulares, las principales son las neuronas y las células gliales o neuroglía (Ridet y col., 1997). La neuroglía es un conjunto de células, que tienen como función general el mantenimiento de las condiciones homeostáticas de las neuronas entre las que destacan: la regulación de oxígeno, de nutrientes, control de las funciones metabólicas, regulación de los niveles de neurotransmisores, así como también la regeneración del tejido nervioso, entre otros.

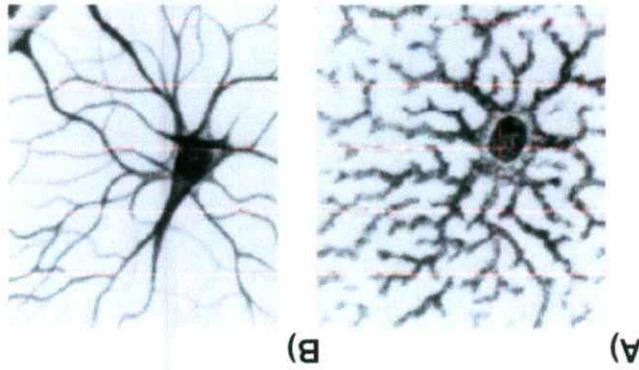
Las células gliales son fundamentales en el desarrollo de las redes neuronales, ya que guían y controlan las migraciones neuronales en las primeras fases de desarrollo. Asimismo, establecen la regulación bioquímica del crecimiento y desarrollo de los axones y dendritas. Además, protegen físicamente a las neuronas del resto de tejidos y de posibles elementos patógenos, al conformar la barrera hematoencefálica (Gómez-Nicola y Nieto-Sampedro, 2008).

##### II.4.1 Tipos de neuroglía.

El SNC de los mamíferos contiene tres principales clases de neuroglia: las células endimarias, las microgliales y las macrogliales, que a su vez se dividen en oligodendrocitos y astrocitos (Gómez-Nicola y Nieto-Sampedro, 2008). Esta clasificación se realizó tomando en cuenta su tamaño y morfología celular. En los últimos años, el estudio de los astrocitos ha tomado gran importancia debido al conocimiento de su participación en funciones que se creían exclusivas de las neuronas, como la transmisión sináptica.

Las ramificaciones de un astrocito alcanzan una distancia de 100  $\mu\text{m}$  a la redonda y pueden tener contacto al mismo tiempo con membranas neuronales y vasculares. Peters y col. (1991) observaron que los astrocitos envuelven una gran cantidad de sinapsis (Figura 9A), de hecho se ha estimado que un solo astrocito puede hacer contacto con más de 100,000 sinapsis. Es aquí, donde las ramificaciones de un astrocito están en íntimo contacto con las terminales pre y

Figura 8. Subtipos de astrocitos. A) astrocito protoplasmático. B) astrocito fibroso. Modificado de Verkhratsky y col., 1998.



Los astrocitos son células caracterizadas por un soma pequeño ( $< 10 \mu\text{m}$  de diámetro) y con una gran cantidad de ramificaciones (extendiéndose hasta  $\sim 100 \mu\text{m}$ ), lo que les permite establecer múltiples contactos con diferentes células del SNC. Pueden identificarse por sus características histológicas, como la presencia de glucógeno y de filamentos compuestos por una proteína única llamada proteína ácido glicial fibrilar-GFAP, por sus siglas en inglés- (Davis y col., 2002).

Los astrocitos tipo I o protoplasmáticos (Figura 8A) se encuentran en la materia gris, presentan una gran cantidad de ramificaciones con varicosidades que les da un aspecto esponjiforme (Verkhratsky y col., 1998; Halassa y col., 2006). Los astrocitos tipo II o fibrosos (Figura 8B) se encuentran en la materia blanca, tienen más filamentos con GFAP, presentan hasta 60 ramificaciones que divergen a partir del soma (Davis y col., 2002).

Los gliotransmisores liberados pueden actuar sobre las neuronas (pre y postsinápticas) para la regulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica (Cuadro 1). A partir de esta evidencia, Araque y col. (1999) definieron a la comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas como "sinapsis tripartita". En particular en el hipocampo, estas interacciones son importantes ya que se estima que aproximadamente el 57% de las sinapsis son tripartitas (Ventura y Harris, 1999). En este sentido, Parpura y col. (1994) mostraron que en la región CA1 del hipocampo, la liberación de glutamato por parte de las neuronas, activaba a dichos receptores metabotrópicos presentes en los astrocitos. A su vez, la activación de estos receptores generaba un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular y la liberación de glutamato (Figura 9B). En este trabajo, el glutamato liberado por los astrocitos modulaba las respuestas neuronales mediadas por NMDAR. Del mismo modo, muchos otros (Figura 9B).

Al igual que lo sucede con las neuronas, los incrementos en la concentración de  $Ca^{2+}$  inducen la liberación de transmisores químicos llamados gliotransmisores en un proceso denominado gliotransmisión. Los astrocitos pueden sintetizar y liberar sustancias neuroactivas como glutamato (Bezzi y col., 1998), D-ser (Mothe y col., 2000), ATP (Coco y col., 2003), óxido nítrico (Ikeda y Murase, 2004) y, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (Stellwagen y Malenka, 2006), entre McCarthy, 1996; Haydon, 2001).

Los astrocitos expresan una gran variedad de transportadores, canales iónicos y receptores de membrana descritos para casi todos los neurotransmisores. Estos receptores producen, de manera directa o indirecta, incrementos en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. De esta manera, los astrocitos son capaces de detectar el neurotransmisor liberado en la sinapsis y responder con oscilaciones de  $Ca^{2+}$  que incluso pueden viajar a través de los astrocitos adyacentes (Porter y

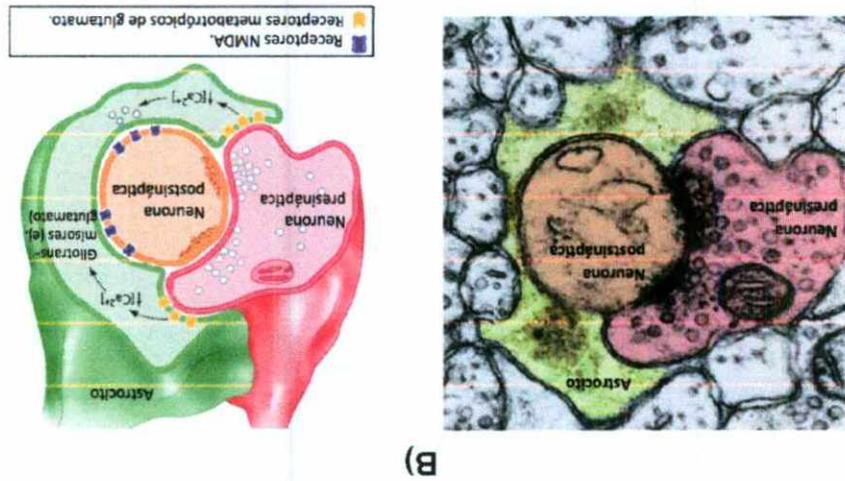
#### 11.4.2.1 Papel de los astrocitos en la transmisión sináptica.

postsinápticas, lo que sugiere una importante participación en procesos como la transmisión sináptica, la neurogénesis y, la sinaptogénesis, entre otros (Mauch y col., 2001; Nedergaard y col., 2003; Halassa y col., 2006).

11.4.2.2 Participación de los astrocitos en la potenciación de largo plazo.

En diversas estructuras del SNC se ha mostrado que los astrocitos participan en la plasticidad sináptica, como la LTP (Yang y col., 2003; Ikeda y Murase, 2004; Panatier y col., 2006). Su participación fue estudiada por el grupo de Yang y col. (2003), quienes utilizando cultivos mixtos de hipocampo (neuronas piramidales y astrocitos de la región CA1) así como rebanadas de hipocampo, mostraron que la inducción de la LTP se bloqueaba en presencia de un antagonista del sitio de unión a la D-ser (DCKA), así como con la enzima que degrada a la D-ser (DAAO). De igual forma, Panatier y col. (2006) en un estudio en el núcleo supraóptico, observaron que durante la lactancia, la cobertura de las sinapsis por lo astrocitos estaba reducida. En consecuencia, menos cantidad de D-ser era provista a los NMDARs, resultando en una depresión de las respuestas. Sin embargo, roedores vírgenes con una mayor cantidad de cobertura sináptica por parte de los astrocitos, y por ende una mayor cantidad de D-ser, sí mostraron la inducción de la LTP.

Figura 9. Participación de los astrocitos en la sinapsis. A) microscopía electrónica mostrando la estrecha asociación entre neuronas (pre y postsinápticas) y astrocitos. B) diagrama de la liberación de  $Ca^{2+}$  gliotransmisores producida por el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  en los astrocitos. Modificado de Fellin y col., 2006.



diversos grupos han mostrado que a través de la liberación de D-ser (co-agonista de los NMDARs), los astrocitos modulan la función de dichos receptores (Mustafa y col., 2004; Mothet y col., 2005).

Se puede definir al aprendizaje como el cambio o alteración en la conducta la corteza temporal y el hipocampo (Kandel, 1991).  
 En humanos, así como en otros mamíferos, los eventos más importantes por los cuales el ambiente altera la conducta, son el aprendizaje y la memoria. Dichos procesos han sido asociados a diversas estructuras cerebrales como la amígdala, el hipocampo y la corteza temporal.

Además del efecto causado por la liberación de la D-ser, se ha mostrado que la liberación de otros gliotransmisores como el óxido nítrico, influyen en la inducción de la LTP en la médula espinal (Ikeda y Murase, 2004). En este sentido, Ikeda y Murase (2004) utilizaron un inhibidor selectivo del metabolismo de los astrocitos, el monofluoroacetato de  $\text{Na}^+$ -MFA- (Largo y col., 1996; Waniewski y Martin, 1998), para analizar el efecto de los astrocitos en la LTP. En este trabajo, los autores encontraron que en presencia de MFA la LTP no se inducía.

Gliotransmisor	Gliotransmisión dependiente de $\text{Ca}^{2+}$	Objetivo	Acciones
Glutamato	Dependiente de $\text{Ca}^{2+}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NMDARs</li> <li>• KARs</li> <li>• mGluR.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Despolarización sincronizada.</li> <li>• Incrementa la frecuencia de la corriente postsináptica.</li> <li>• Incrementa la probabilidad de generar corrientes postsinápticas dependientes de los AMPARs.</li> </ul>
ATP	Desconocido.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P2XR</li> <li>• P2YR</li> <li>• A1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inserción de AMPARs en el sitio postsináptico.</li> <li>• Acciones parácrinas en las ondas de <math>\text{Ca}^{2+}</math> de astrocitos en cultivo.</li> <li>• Degradación de la adenosina resulta en la supresión de la transmisión sináptica.</li> </ul>
D-serina	Dependiente de $\text{Ca}^{2+}$	• NMDARs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa la transmisión sináptica dependiente de los NMDARs, importante para la inducción de la LTP en muchas regiones cerebrales.</li> </ul>

Cuadro 1. Efecto de los gliotransmisores sobre la transmisión sináptica. LTP, potenciación de largo plazo; NMDARs, receptores N-metil-D-aspartato; AMPARs, receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico; P2XR, receptor purinérgico; P2YR, receptor purinérgico; A1, receptor de adenosina 1; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; ATP, adenosín trifosfato; KARs, receptores de cainato. Modificado de Halassa y col., 2006.

memoria que son fundamentales, y ciertas regiones del cerebro son mucho más  
 Para la formación de la MLP existen diversos tipos de almacenaje de la  
 (Davis y Squire 1984; Kandel, 1991).

involucra cambios estructurales que almacenen la memoria a lo largo del tiempo  
*de novo* de RNA mensajero y de proteínas. La consolidación, en este caso,  
 modificaciones covalentes o de proteínas pre existentes, la MLP requiere la síntesis  
 semanas o incluso años (Polster y col., 1991). Mientras que la MCP requiere sólo  
 de minutos a horas; y la memoria de largo plazo (MLP), la cual persiste por días,  
 menos en dos fases temporales distintas: memoria de corto plazo (MCP), que dura  
 El almacenamiento de la memoria en mamíferos es comúnmente dividida al

#### 11.5.1 Tipos de memoria.

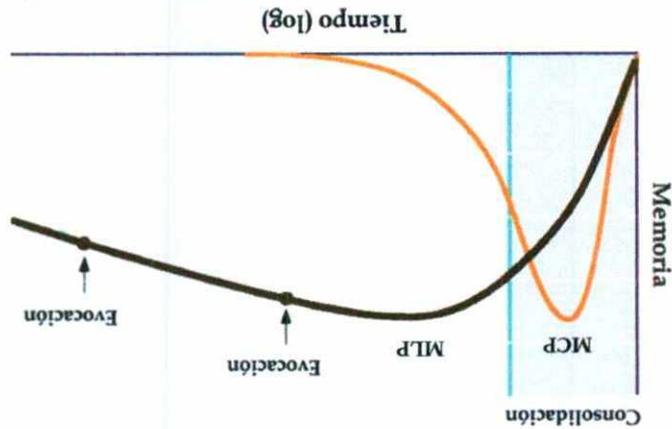
separadamente y en diferentes sitios de almacenamiento (Kandel, 1991).  
 involucra traer diferente tipo de información que estaba almacenada  
 la información se puede recuperar y usar (Figura 10). El proceso de recuperación  
 recuperación (evocación) de la información se refiere a los procesos por los cuales  
 mecanismo y los sitios en donde la memoria es retenida. Por último, la  
 para su almacenamiento (Figura 10). Por almacenamiento se puede entender el  
 que alteran la información lábil y acabada de almacenar de modo que se establezca  
 pueda ser recuperada. Se puede entender a la consolidación como los procesos  
 de la información para su permanencia y la posibilidad de que posteriormente  
 vez codificado el conocimiento, éste se guarda. Este paso implica la consolidación  
 información nueva es atendida y procesada la primera vez que se encontró. Una  
 entiende por codificar el conocimiento, como los procesos por los cuales  
 codificado, guardado y posteriormente recuperado (Bliss y Collingridge, 1993). Se  
 memoria se puede definir como el proceso por el cual el conocimiento es  
 El proceso que perpetúa el aprendizaje, es la formación de la memoria. La  
 1991).

adaptación a su entorno y su consecuente sobrevivencia al mismo (Ninomiyá,  
 cambios neurofisiológicos. Esta alteración ha permitido a los organismos una mejor  
 de un organismo producto de una experiencia y de la cual se pueden inferir

El hipocampo es importante para el almacenaje y codificación consciente de todo tipo de información. Se ha demostrado que un daño selectivo en el hipocampo o en áreas con las que el hipocampo se conecta (las cortezas peririnal y parahipocampal), produce una clara ausencia de la MLP (Kandel, 1991).

Para el almacenamiento de la MLP se requiere de un componente general que incluye las estructuras de la región del lóbulo temporal (medial y ventral), que incluyen entre otras estructuras al hipocampo (Kandel, 1991).

Figura 10. Esquema de la formación de la MLP en función del tiempo. Este último está graficado en escala logarítmica. MCP, memoria de corto plazo; MLP, memoria de largo plazo. Modificado de Dudai, 2004.

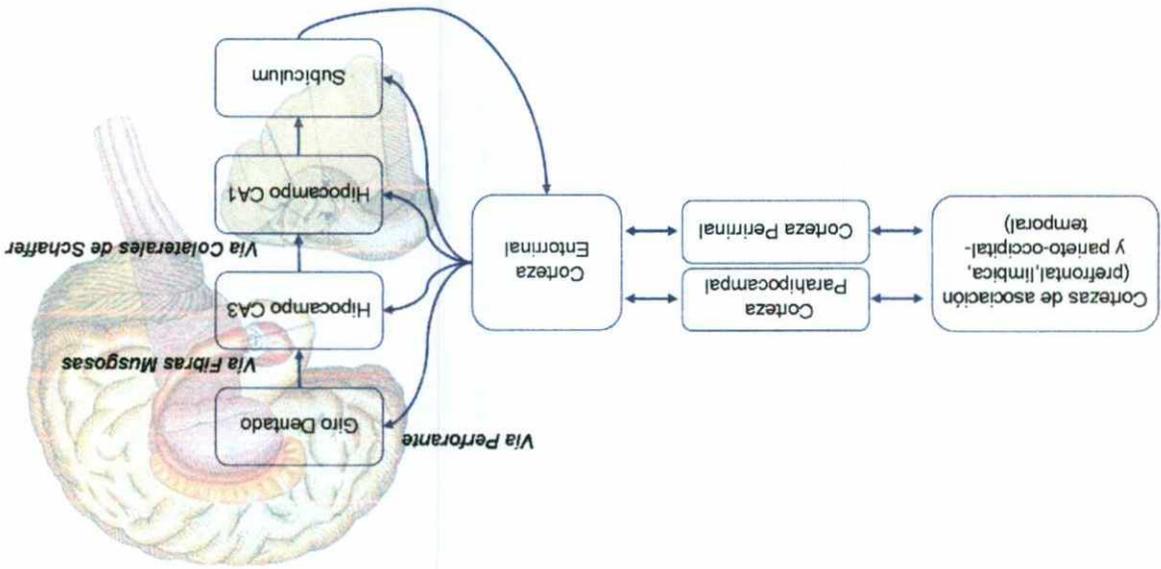


importantes para un tipo de almacenaje que otras. Se han distinguido dos tipos de MLP. La primera, es la memoria implícita o no declarativa, la cual se refiere a la información de cómo realizar alguna tarea y la cual se recupera de manera inconsciente. De esta manera, está involucrada típicamente en habilidades motoras o perceptuales, y está fuertemente conectada a las condiciones del estímulo original en las que el aprendizaje ocurrió. La segunda, la memoria explícita o declarativa corresponde al almacenamiento y recuperación consciente de información relacionada con acontecimientos específicos y experiencias personales, así como de conceptos y conocimientos. Esta, es altamente plástica e involucra la asociación de múltiples piezas de información (Kandel, 1991).

II.5.3 Participación de la nicotina en la memoria de largo plazo.

Se ha mostrado que la administración de Nic mejora la consolidación de la MLP en tareas dependientes del hipocampo. En este sentido, Ramírez y col. (2004) mostraron que una sola aplicación de Nic en la región CA1 del hipocampo era capaz de incrementar la MCP y la MLP en ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria. El efecto de la Nic estaba mediado por los receptores  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$ , ya que en presencia de sus antagonistas (metillicaconitina y la dihidro- $\beta$ -eritroidina, respectivamente) se observó un efecto amnésico. Del mismo modo, Soci y col. (1995) mostraron que la administración crónica de Nic en ratas de 25 a 26 meses

Figura 11. Vías aferentes y eferentes en la formación de la MLP en el hipocampo. Modificado de Kandel, 1991.



Antes que el hipocampo consolide la MLP, es necesario que la información se procese en diferentes lugares. Primero, la información sensorial es enviada a una o más de las cortezas de asociación (la corteza prefrontal, límbica y parieto-occipital-temporal). Estas cortezas se comunican en serie con las cortezas parahipocámpica y peririnal, las cuales a su vez hacen contacto con la corteza entorrinal. Finalmente, las proyecciones de la corteza entorrinal (principales aferencias del hipocampo) llevan la información hacia el giro dentado, el hipocampo y el subiculum. Todas estas vías son bidireccionales (Figura 11).

A pesar del reconocimiento que han tenido los astrocitos como elementos importantes para la comunicación neuronal y el establecimiento de procesos cognitivos como la memoria, se conoce poco acerca de los mecanismos mediante los cuales los astrocitos participan en la consolidación de la memoria. Más aún, se desconoce por completo el papel de los astrocitos como intermediarios para que sustancias como la nicotina faciliten la MLP.

De manera interesante, diversos estudios han mostrado que, al igual que en la LTP, la liberación de D-ser por parte de los astrocitos facilita la MLP. En este sentido, Zhang y col. (2008) demostraron que la administración sistémica de la D-ser en ratas entrenadas en el laberinto acuático de Morris revierte el efecto amnésico causado por el efecto del MFA.

Los astrocitos participan activamente en los procesos de la LTP, lo que ha sugerido su participación en los procesos de la formación de la MLP. De este modo, Gibbs y col. (1996) utilizando pollos viejos entrenados en la tarea de evitación inhibitoria de discriminación, mostraron que la inhibición selectiva de los astrocitos con metionina sulfóximina (MSO) en la región neocortical, impide la consolidación de la memoria. De igual forma, O'Dowd y col. (1994), mostraron que la inhibición selectiva de los astrocitos con MFA en el estriado, reduce (de manera dosis-dependiente) la MLP.

#### 11.5.4 Participación de los astrocitos en la memoria de largo plazo.

de edad, mejora el desempeño en el laberinto acuático de Morris. De igual manera, Levin y Rose (1990) mostraron que la aplicación crónica de Nic (sistémica) en ratas machos y hembras facilita la memoria en el laberinto radial y, que dicho efecto perdura mucho tiempo después de haberse retirado la Nic. Por otro lado, Hiramatsu y col. (2002) utilizando ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria, mostraron que la administración (sistémica) crónica de Nic, revertía el efecto amnésico producido por la lesión selectiva de neuronas colinérgicas en la región CA1 del hipocampo. Estos resultados demuestran la importancia de la actividad de los nAChRs en la consolidación de la memoria, así como su facilitación por parte de la Nic.

### III. HIPÓTESIS.

Los astrocitos de la región CA1 del hipocampo, participan en la consolidación de la memoria facilitada por la nicotina a través de la D-serina.

## IV. OBJETIVOS.

### IV.1 General.

- Evaluar la participación de la D-serina proveniente de los astrocitos de la región CA1 del hipocampo en la consolidación de la memoria facilitada por nicotina.

### IV.2 Específicos.

- Determinar si la administración aguda de nicotina a nivel sistémico facilita la consolidación de la memoria.  
En la región CA1 del hipocampo:
  - Estudiar la participación de los astrocitos en la consolidación de la memoria.
  - Analizar la participación de los astrocitos en la consolidación de la memoria facilitada por la administración aguda de nicotina.
  - Establecer la participación de la D-serina en la consolidación de la memoria facilitada por la administración aguda de nicotina.

## V. METODOLOGÍA.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, para el uso de animales experimentales y está acorde a las normas estipuladas en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" del NIH (ILAR, 1996).

### V.1 Materiales

- Aguja dental, Dimeba S.A. de C.V.
- Cánulas (10 mm, núm. 23).
- Jeringa Hamilton (10 µL), Hamilton Company.
- Tapones (10 mm).
- Tornillos pequeños, Internacional de Equipos Científicos S.A. de C. V.
- Tubo de acero inoxidable (núm. 23), Internacional de Equipos Científicos S.A. de C. V.
- C. V.
- Tubo de aguja hipodérmica (núm. 30), Internacional de Equipos Científicos S.A. de C. V.
- Tubo de polietileno (PE-20), Dimeba S.A. de C.V.
- Varilla de acero inoxidable, Internacional de Equipos Científicos S.A. de C. V.

### V.1.1 Reactivos.

- Acido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA).
- Alcohol absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), J.T. Baker.
- Atropina, Laboratorios Pisa S.A. de C.V.
- Cemento dental, NicTone.
- Cloruro de sodio (NaCl), J.T. Baker.
- D-ser ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$ ), Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA).

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología, con un peso entre 250 a 350 g al momento de la cirugía. Las ratas fueron trasladadas del bioterio general al interno del laboratorio por lo menos una semana antes de la cirugía con la finalidad de que se adaptaran a las nuevas condiciones ambientales. Todas las ratas se mantuvieron de manera individual en cajas habitación (47.5 X 26 X 20 cm), con alimento y agua *ad libitum*. Las ratas se

### V.1.3 Material biológico.

- Unidad de corriente constante (CCU-1A), Grass-Instruments Co.
- Microscopio (S1000957), Leica.
- Estimulador eléctrico (S48), Grass-Instruments Co.
- Esterotáxico, Stoelting, CO; Illinois.
- Criostato (CM 1850), Leica.
- U.S.A.
- Bomba de infusión lenta (WPI modelo sp200i), World Precision Instruments, Inc.,
- Balanza, Reavel S.A. de C.V.

### V.1.2 Equipos.

- Xileno ( $C_6H_7(CH_3)_2$ ), J.T. Baker.
- Violeta de cresilo ( $C_{18}H_{15}N_3O_3$ ), Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA).
- Solución salina 0.9%, Laboratorios Pisa S.A. de C.V.
- S.A. de C.V.
- Pentobarbital sódico ( $C_{11}H_{18}N_2NaO_3$ ), Sedalphorte; Salud y Bienestar Animal, Aldrich (St. Louis MO, USA).
- Nicotina ((-)-nicotina (tartrato hidrógeno de sal)), ( $C_{10}H_{14}N_2 \cdot 2C_4H_6O_6$ ); Sigma
- Monofluoroacetato de sodio ( $FCH_2COONa$ ), Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA).
- Fosfato monobásico de potasio ( $KPO_4$ ), J.T. Baker.
- Fosfato dibásico de potasio ( $K_2PO_4$ ), J.T. Baker.
- Formaldehído ( $CH_2O$ ), J.T. Baker.

mantuvieron con temperatura controlada ( $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) y un ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad (el encendido de la luz fue a las 7:00 am).

#### V.1.4 Cámara de condicionamiento de evitación inhibitoria.

El entrenamiento de evitación inhibitoria y la prueba de retención se realizaron en una caja de condicionamiento constituida por dos compartimientos de las mismas dimensiones (30 x 30 x 30 cm) separados por una puerta tipo guillotina

(Figura 12A).

El piso del compartimiento de seguridad está hecho con barras de acero inoxidable de 6 mm de diámetro separadas con 1.5 cm entre sí (Figura 12B). Las paredes del compartimiento de castigo están compuestas de dos placas de acero inoxidable las cuales se encuentran separadas en la mitad del piso por una ranura de 1 cm, dando una forma de V, lo cual permitió que los sujetos hicieran contacto con ellas todo el tiempo y recibieran el choque eléctrico (Figura 12B). El compartimiento de castigo podía ser electrificado utilizando un estimulador de pulsos cuadrados (Grass-Instruments Co., modelo S48) conectado en serie con una unidad de corriente constante (Grass-Instruments Co., modelo CCU-1A). La cámara de condicionamiento está ubicada en un cuarto sonooamortiguado (2.44 X 1.95 X 2.50 m) y con baja iluminación provista de un enmascarador de ruido (BRS/LVE, modelo AU-902).

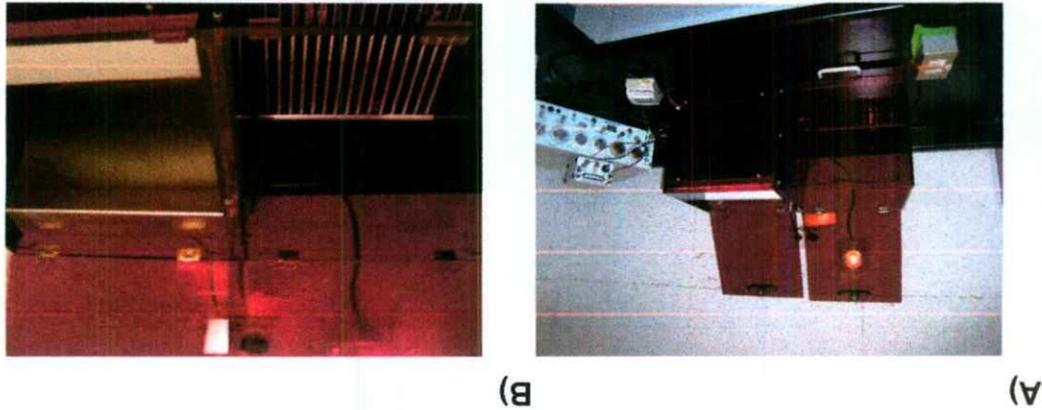


Figura 12. Equipo utilizado en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra la cámara de evitación inhibitoria (A) y un acercamiento a los compartimientos de seguridad -izquierda- y de castigo -derecha- (B).

## V.2 Métodos.

### V.2.1 Cirugía.

Se realizó en todas las ratas un procedimiento quirúrgico para la implantación de cánulas en la región CA1 del hipocampo. Brevemente, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y se les administró atropina (0.4 mg/ml) para evitar complicaciones respiratorias. Una vez anestesiadas, se rasuró la piel del cráneo y se fijaron en el aparato estereotáxico. Se limpió la zona con una solución antiséptica y se hizo una incisión de 1.5 cm de largo en sentido anteroposterior sobre la línea media de la cabeza. Se levantó el tejido perióstico y se hizo un orificio a través del cual se introdujo una cánula guía (10 mm de largo, del número 23). Las cánulas se implantaron en la región CA1 del hipocampo (bilateral) de acuerdo a las coordenadas: AP, - 4.0 mm de la Bregma; ML,  $\pm$  2.6 mm de la línea media; y DV, - 2.55 mm de la superficie del cráneo (Paxinos y Watson, 2005). Las cánulas fueron sujetadas a la superficie del cráneo con cemento dental y tornillos, y se les colocó un tapón para mantener la vía permeable. Al término de la implantación se les inyectó 1 ml de solución salina isotónica para evitar deshidratación. Para su recuperación, las ratas permanecieron una semana en el bioterio interno del laboratorio.

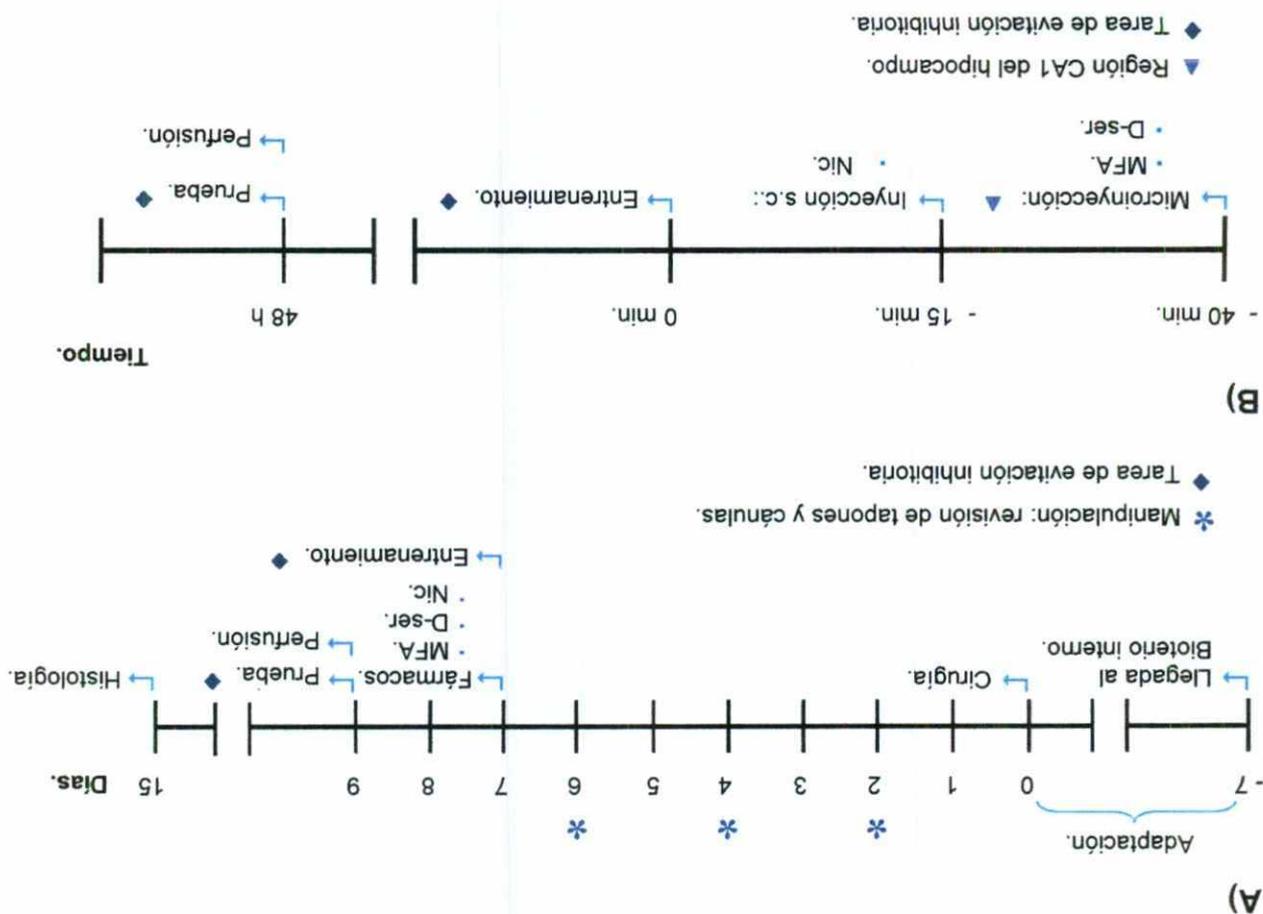
### V.2.2 Manipulación.

Las ratas fueron manipuladas tres días alternados (Figura 13A) antes del día del experimento, siguiendo el mismo horario en el que se desarrollaron las sesiones de entrenamiento y de prueba (entre 9:00 am y 3:00 pm). La manipulación consistió en sacar a la rata de su caja, revisar los tapones y sujetarla simulando la infusión de las sustancias, la cual duró de tres a cinco minutos por rata. En el último día de manipulación se le colocó un inyector falso con las medidas de la aguja empleada durante la infusión (11 mm).

### V.2.3 Administración de fármacos.

Todos los fármacos administrados para estos experimentos fueron comprados

Figura 13. Esquema del diseño experimental. A) seguimiento temporal para cada grupo experimental. B) relación temporal de la administración de fármacos para cada sesión en la tarea de evitación inhibitoria.



a Sigma Aldrich (St. Louis MO, USA) y disueltos en solución salina al 0.9%. La D-ser (100  $\mu$ M) y el MFA (10 mM, excepto en donde se indica) se administró tópicamente (microinyección) en la región CA1 del hipocampo (bilateral), 40 min antes del entrenamiento (Figura 13B) con ayuda de una bomba de infusión lenta. Para esto, se conectó una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l a un inyector de 11 mm de longitud, fabricado con un tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 30. La infusión (0.5  $\mu$ l) se realizó durante 1 minuto y se dejó el inyector 1 minuto más para permitir una mejor difusión. Por su parte, la Nic (0.4 mg/kg, excepto en donde se indica) se administró por vía subcutánea (s.c.) 15 minutos antes del entrenamiento (Figura 13B). Los grupos que no recibieron drogas (Nic, D-ser o MFA) recibieron vehículo (solución salina al 0.9%).

V.2.4 Tarea de evitación inhibitoria.  
 Se utilizó la tarea de evitación inhibitoria o pasiva para la evaluación de la consolidación de la MLP en ratas entrenadas en grupos independientes. La tarea consistió en una sesión de entrenamiento y en una de prueba.

#### V.2.4.1 Sesión de entrenamiento.

Las ratas fueron colocadas en el compartimiento de seguridad donde permanecieron por 10 s. En seguida, la puerta de separación fue abierta y se permitió a la rata pasar al compartimiento de castigo (Figura 14A). Una vez que la rata entró por completo a este compartimiento, la puerta fue cerrada y se le aplicó un choque eléctrico de 0.7 mA (excepto en donde se indica) por 5 s. Después del choque, la puerta se abrió para permitirle a la rata escapar al compartimiento de seguridad (Figura 14B) en donde se mantuvieron por 30 s para su recuperación antes de ser regresadas a sus cajas habitación.

Se analizó el tiempo que tardó la rata para pasar al compartimiento de castigo, latencia de entrenamiento, así como el tiempo que tardó la rata en pasar al compartimiento de seguridad, latencia de escape (Figura 14). En el caso de que la rata no cruzara, se tomó como corte arbitrario 100 s y se dio por terminada la sesión.

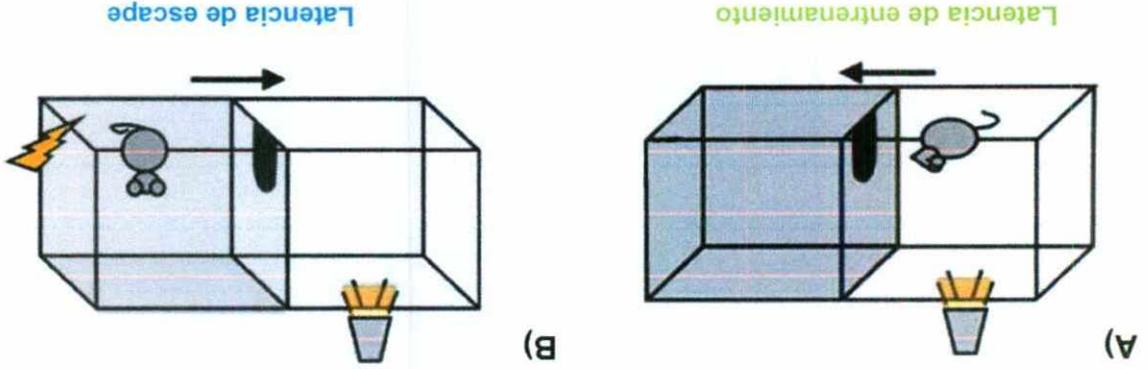
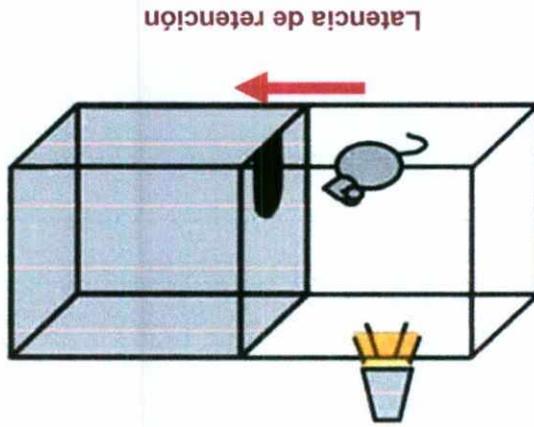


Figura 14. Representación de la sesión de entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria. Las latencias de entrenamiento (A) y de escape (B), representan el tiempo que tarda la rata en entrar y salir del compartimiento de castigo, respectivamente (las flechas indican la dirección del movimiento de la rata).

V.2.5 Histología.

Con el propósito de localizar las puntas de las cánulas y los inyectores, se realizó un análisis histológico. Brevemente, las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidas con una solución salina isotónica seguida de formaldehído al 10%. Una vez terminada la perfusión se extrajo el cerebro y se colocó en un frasco con una solución de formaldehído al 10% en donde permanecieron por 6 días. Se realizaron cortes de 50  $\mu\text{m}$  de espesor con ayuda de un criostato y fueron teñidos con la técnica de Nissl. Para el análisis estadístico, sólo fueron tomadas en cuenta aquellas ratas cuyas cánulas e inyectores se localizaran en la región CA1 del hipocampo (Figura 16).

Figura 15. Representación de la sesión de prueba en la tarea de evitación inhibitoria. La flecha indica la dirección posible del movimiento de la rata.

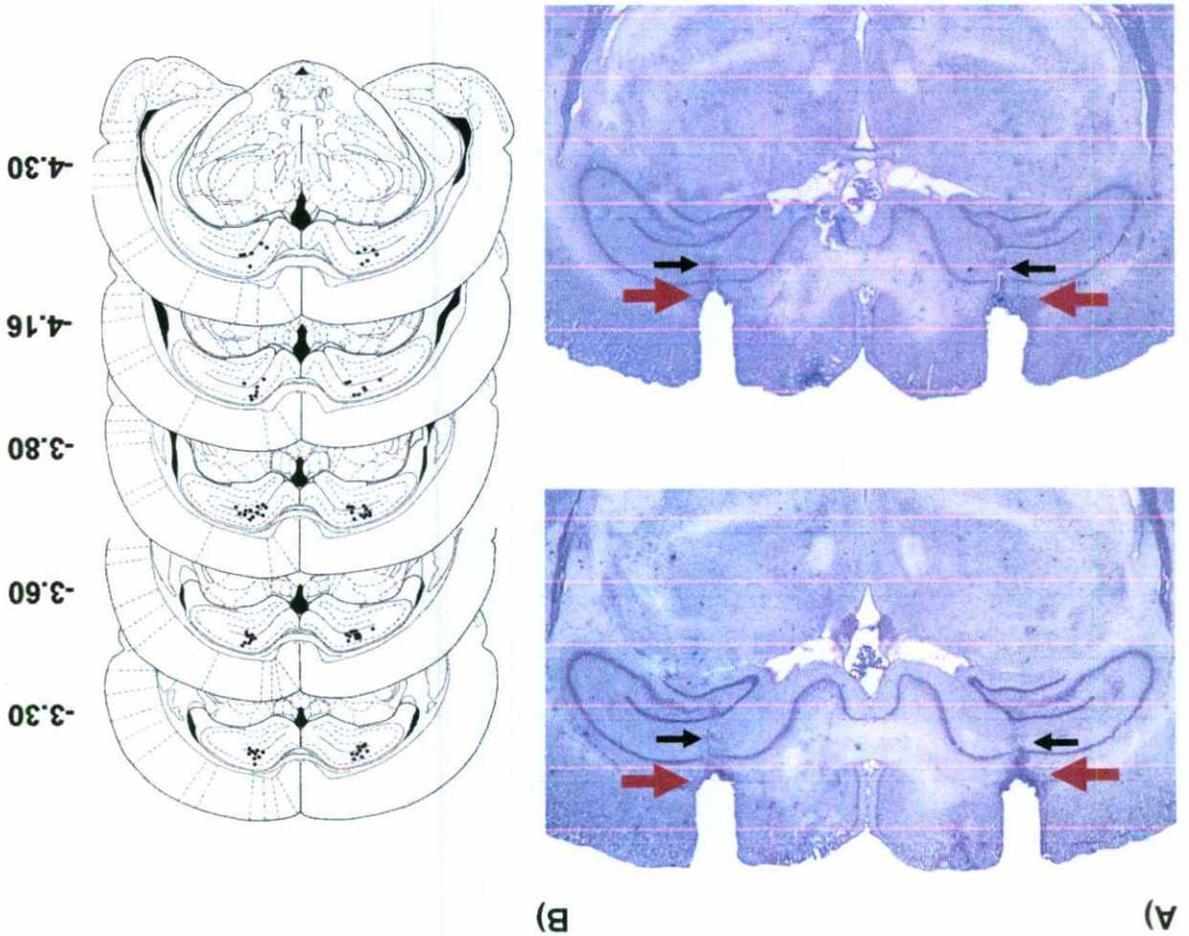


V.2.4.2 Sesión de prueba.

La sesión de prueba se realizó 48 h después del entrenamiento, en la cual se evaluó la retención de la experiencia aversiva (Figura 15). Esta sesión se realizó del mismo modo que la de entrenamiento, con la excepción de que el choque eléctrico no fue aplicado. El tiempo que tardó la rata en pasar del compartimiento de seguridad al de castigo (latencia de retención) fue medido. Se tomó como corte arbitrario 600 s en el caso de que la rata no cruzara.

V.2.6 Análisis estadístico.  
 Debido a que la variable dependiente (latencia de retención) no sigue una distribución normal, se utilizó una prueba ANOVA no paramétrica Kruskal-Wallis y como prueba post-hoc la U de Mann-Whitney, para analizar (en forma independiente) las latencias de entrenamiento, escape y retención. Se tomó como significativas aquellas diferencias con un valor de  $p \leq 0.05$ .

Figura 16. Fotomicrografías de los cortes histológicos. A) se muestra la localización en la región CA1 del hipocampo. B) representación de los sitios en donde se encontraron los inyectores en la región CA1 del hipocampo en los diferentes cortes coronales en varios niveles del eje anteroposterior en relación a Bregma. Modificado del atlas de Paxinos y Watson, 2005.



### V.3 Diseño experimental.

#### V.3.1 Curva intensidad-respuesta.

Para establecer la intensidad mínima de corriente del choque eléctrico que produjera una memoria susceptible a la facilitación, cuatro grupos de ratas fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria. Se utilizaron cuatro intensidades del choque eléctrico, 0.4, 0.5, 0.6 ó 0.7 mA.

#### V.3.2 Curva dosis-respuesta de nicotina.

Para determinar la dosis de Nic con la que se facilitara la MLP, el efecto de diferentes dosis (0.2, 0.4, ó 0.6 mg/kg) fueron analizadas. Para esto, tres grupos de ratas fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria.

#### V.3.3 Curva dosis-respuesta de monofluoroacetato.

Para analizar la participación de los astrocitos en la MLP, se realizó primero una curva dosis-respuesta. Para esto, cuatro grupos de ratas fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria en presencia de diferentes dosis (5, 10, 20 ó 40 mM) de un inhibidor del metabolismo de los astrocitos (MFA).

#### V.3.4 Efecto del monofluoroacetato sobre la consolidación de la memoria

facilitada por nicotina.

Con la finalidad de analizar el papel de los astrocitos en la MLP facilitada por Nic, se entrenó un grupo en la tarea de evitación inhibitoria en presencia de MFA

(10 mM) y de Nic (0.4 mg/kg).

#### V.3.5 Efecto de la D-serina sobre la consolidación de la memoria normal y

facilitada por nicotina.

Con el propósito de estudiar si la participación de los astrocitos en la MLP

normal y la facilitada por nicotina dependía de la D-ser, se analizó la latencia de retención en ratas tratadas con MFA (10 mM) y MFA (10 mM) + Nic (0.4 mg/kg) en presencia de D-ser (100 µM).

## VI. RESULTADOS.

### VI.1 Curva intensidad-respuesta.

El análisis de los resultados mostró que las diferentes intensidades del choque no produjeron diferencias significativas en las latencias de entrenamiento (Figura 17A) y de escape (Figura 17B). Las ratas entrenadas con una intensidad de 0.7 mA presentaban una mayor latencia de retención (Figura 17C), en comparación con las ratas entrenadas con 0.4, 0.5 y 0.6 mA (Kruskal-Wallis,  $p = 0.003$ ). La Prueba U de Mann-Whitney indicó que hubo diferencias significativas entre el grupo que recibió el choque de 0.7 mA y los grupos que recibieron 0.4 mA ( $p < 0.001$ ), 0.5 mA ( $p < 0.01$ ) y 0.6 mA ( $p < 0.02$ ).

### VI.2 Curva dosis-respuesta de nicotina.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los grupos en relación a sus latencias de entrenamiento (Figura 18A) ni de escape (Figura 18B). Como se muestra en la Figura 18C, las latencias de retención del grupo con el tratamiento de 0.4 mg/kg fueron significativamente mayores en comparación con los demás grupos (Kruskal-Wallis,  $p = 0.05$ ). El análisis con la prueba U de Mann-Whitney mostró diferencias con el control ( $p < 0.02$ ), el grupo tratado con 0.2 mg/kg ( $p > 0.02$ ) y 0.6 mg/kg ( $p > 0.02$ ) de Nic.

### VI.3 Efecto del monofluoroacetato sobre la consolidación de la memoria normal y la facilitada por nicotina.

Al igual que con la Nic, el análisis estadístico de las latencias de entrenamiento (Figura 19A) y de escape (Figura 19B) no mostraron diferencias significativas entre los grupos. De manera interesante, sí hubo diferencias significativas en las latencias de retención de las ratas tratadas con MFA (Kruskal-Wallis,  $p = 0.03$ ), mostrando una disminución con las dosis 10, 20 y 40 mM (U de Mann-Whitney,  $p > 0.001$ ,  $p > 0.05$  y  $p > 0.02$ , respectivamente) en comparación contra el control (Figura 19C).

Figura 17. Curva intensidad-respuesta. Se grafica la mediana y el rango intercuartilar de las latencias de entrenamiento (A), de escape (B) y de retención (C) de los grupos de ratas ( $n=6-10/\text{grupo}$ ) entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 0.4, 0.5, 0.6 ó 0.7 mA. \*,  $p \leq 0.05$  prueba U de Mann-Whitney con respecto a los demás grupos.

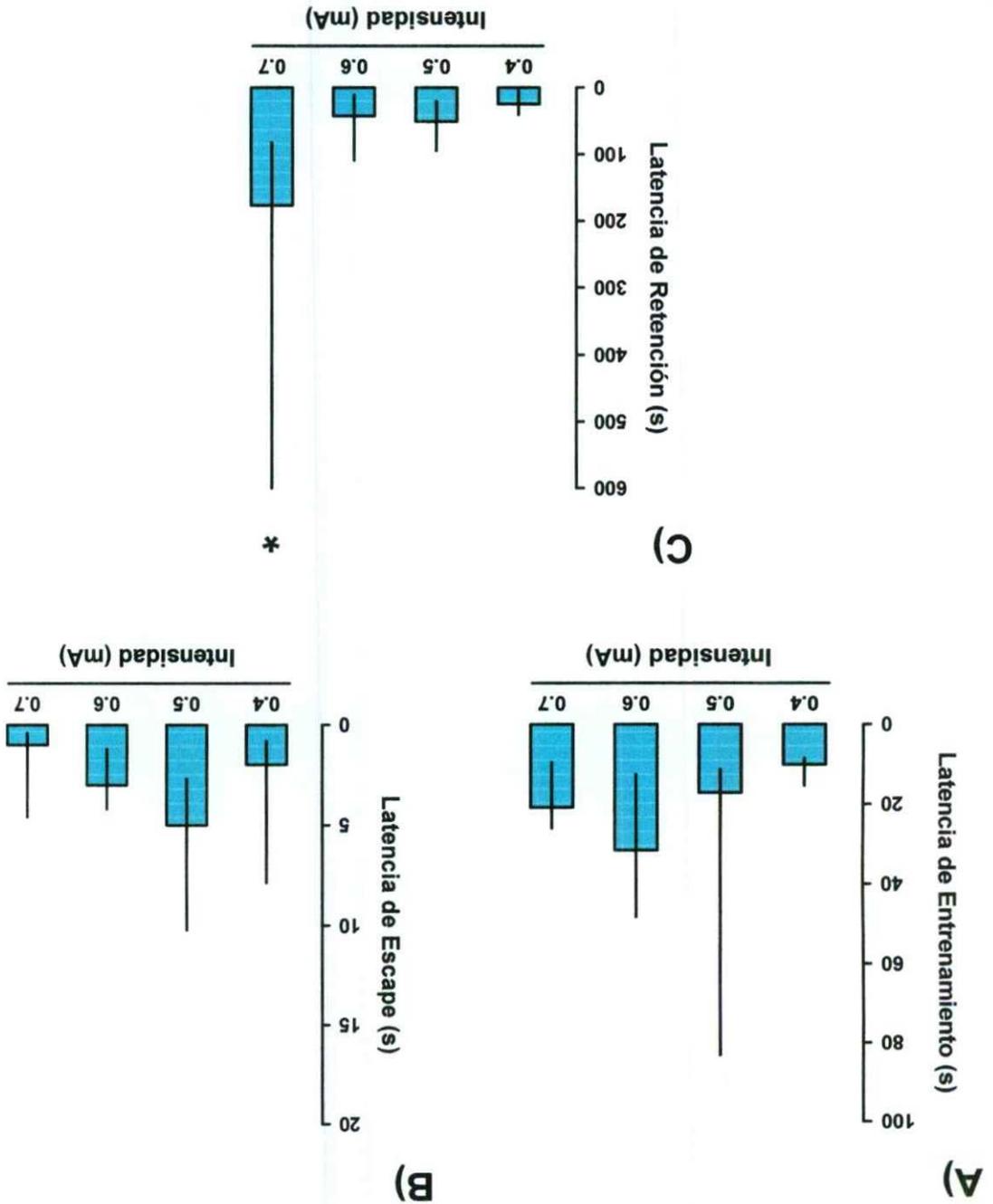


Figura 18. Efecto de la Nic en la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria. Se grafica la mediana y el rango intercuartilar de las latencias de entrenamiento (A), de escape (B) y de retención (C) de los grupos de ratas (n= 6-10/grupo) tratados con 0.2, 0.4 ó 0.6 mg/kg de Nic. \*,  $p \leq 0.05$  prueba U de Mann-Whitney con respecto a los demás grupos.

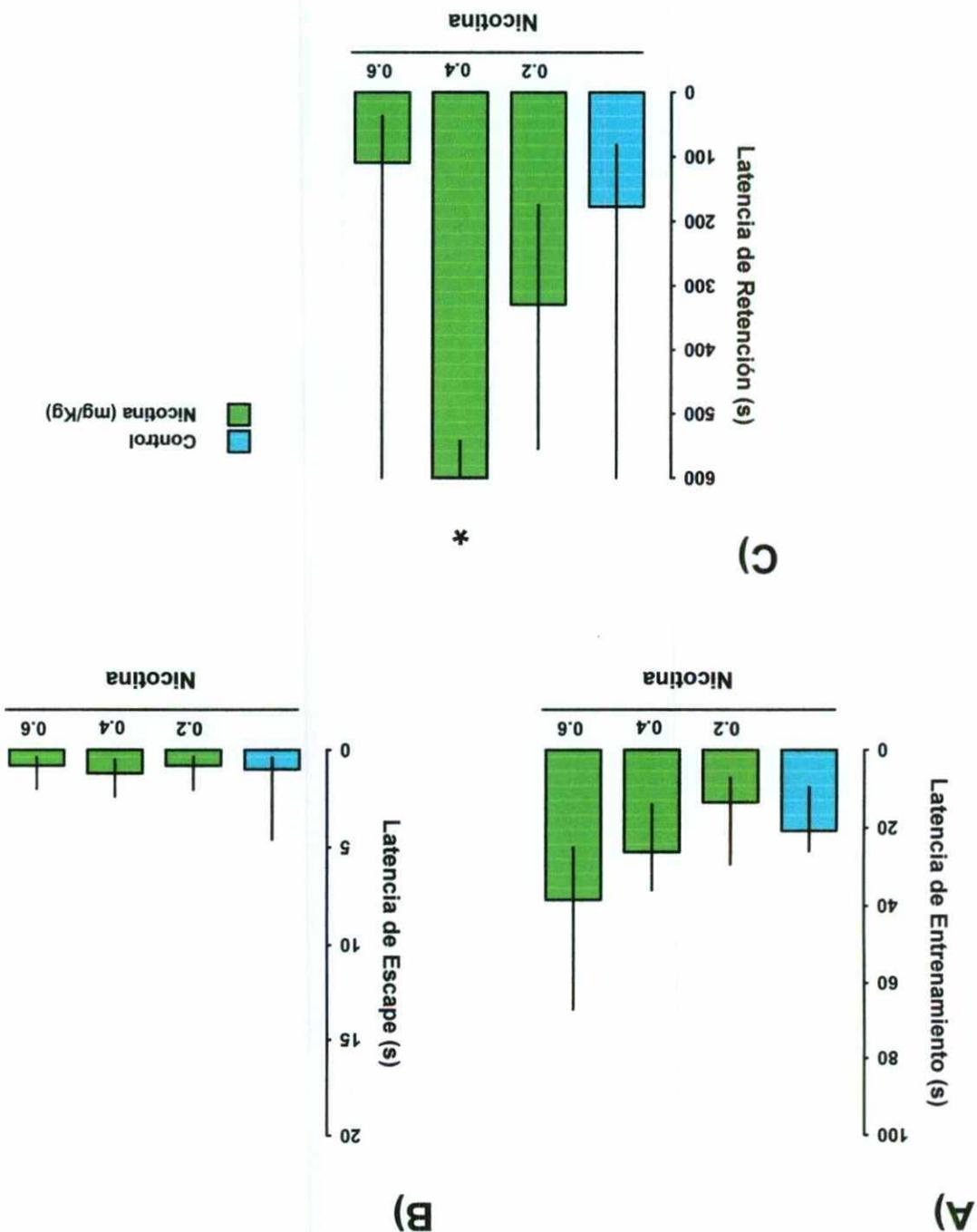


Figura 19. Efecto del MFA en la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria. Se grafica la mediana y el rango intercuartilar de las latencias de entrenamiento (A), de escape (B) y de retención (C) de los grupos de ratas (n=6 - 10/grupo) tratados con vehículo, 5, 10, 20 ó 40 mM de MFA. \*,  $p \leq 0.05$  prueba U de Mann-Whitney con respecto al grupo control.

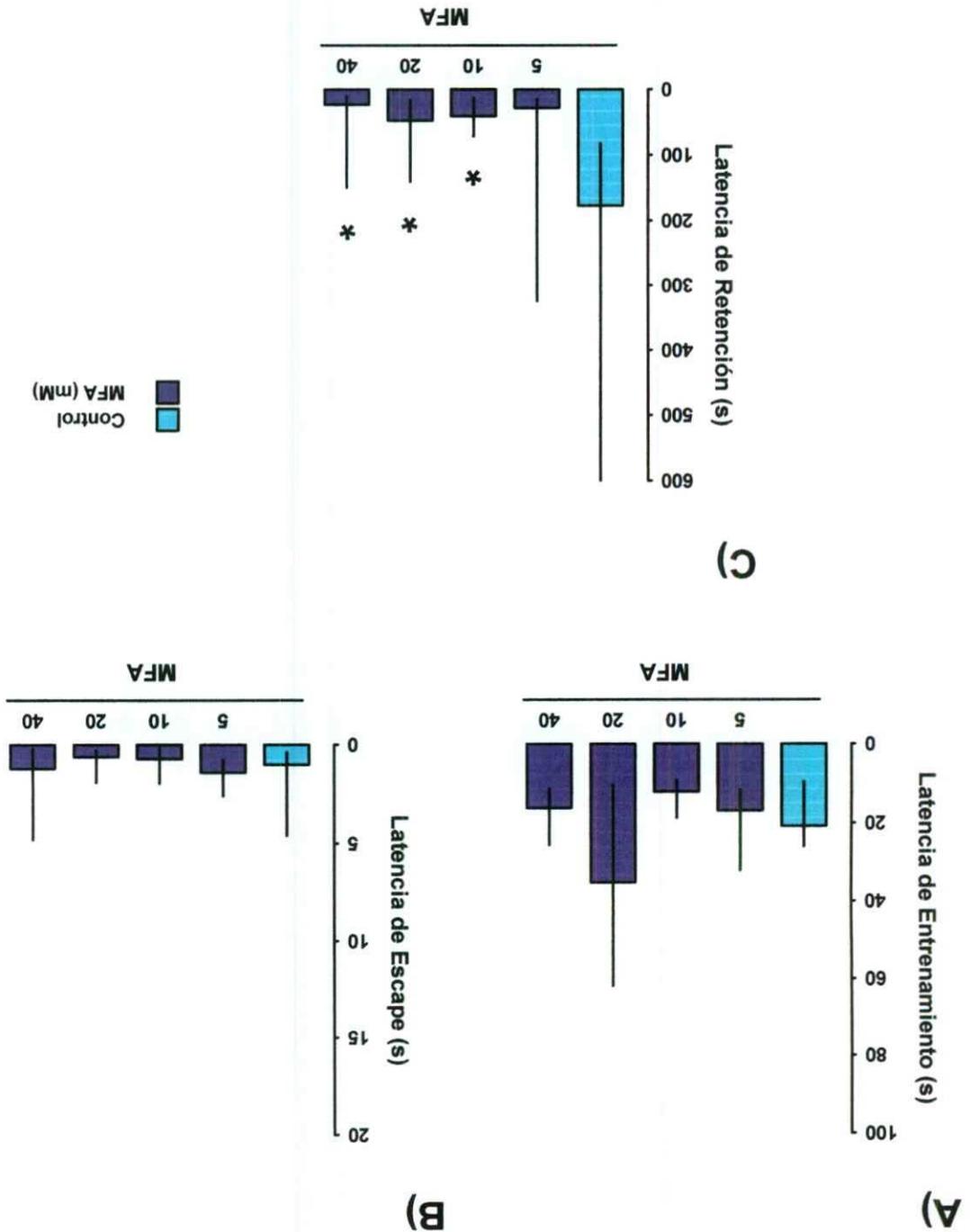
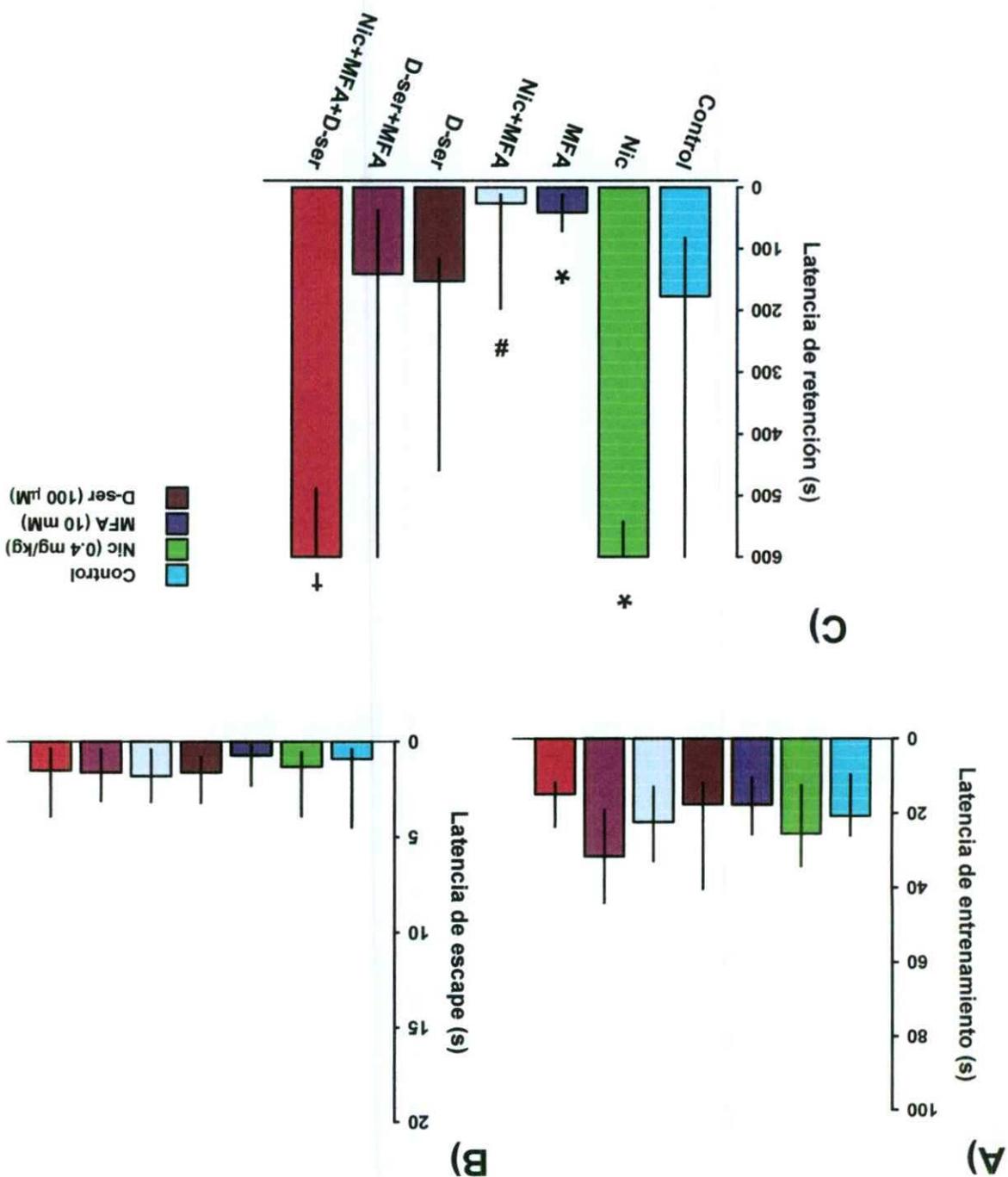


Figura 20. Efecto del MFA y la D-ser en la consolidación de la memoria facilitada por Nic en la tarea de evitación inhibitoria. Se grafica la mediana y el rango intercuartilar de las latencias de entrenamiento (A), de escape (B) y de retención (C) de los grupos de ratas (n=6-10/grupo). \*, p < 0.05 prueba U de Mann-Whitney respecto al control. #, p < 0.05 prueba U de Mann-Whitney respecto al grupo tratado únicamente con Nic. †, p < 0.05 prueba U de Mann-Whitney respecto al grupo tratado con Nic y MFA.



Una vez establecido el papel de los astrocitos en la consolidación de la memoria, nos preguntamos si éstos también participaban en la MLP facilitada por nicotina. Nuevamente, no se encontraron diferencias significativas entre las latencias de entrenamiento (Figura 20A) y de escape (Figura 20B) entre los grupos de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p = 0.0001$ ), el análisis con la U de Mann-Whitney mostró que la Nic es incapaz de facilitar la MLP en presencia de MFA ( $p < 0.0004$ ) como se puede observar en la Figura 20C.

VI.4 Papel de la D-serina sobre la consolidación de la memoria normal y la facilitada por nicotina.

Al igual que con la Nic y el MFA, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre las latencias de entrenamiento (Figura 20A) y de escape (Figura 20B) entre todos los grupos. De manera interesante, las latencias de retención sí mostraron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p = 0.0001$ ), el análisis con la prueba U de Mann-Whitney mostró que la aplicación de D-ser por sí sola no produjo cambios en la latencia de retención ( $p < 0.8$ ) como se muestra en la Figura 20C. En contraste, sí fue capaz de revertir los efectos amnésicos del MFA en la MLP normal ( $p < 0.02$ ) y facilitada por Nic ( $p < 0.0005$ ) como se muestra en la Figura 20C. Ambos grupos son estadísticamente iguales al grupo control ( $p > 0.9$ ) y al grupo tratado únicamente con Nic ( $p > 0.059$ ).

## VII. DISCUSIÓN.

### VII.1 Participación de los astrocitos en la consolidación de la memoria.

En la actualidad, existe poca información en relación al papel de los astrocitos en los procesos mnémicos (memoria). En este sentido, en el presente trabajo, mostramos que los astrocitos son elementos importantes para la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria y que muy probablemente lo hace a través de la liberación de D-ser. Aunque la participación de los astrocitos sobre la MLP había sido mostrado anteriormente en pollos por el grupo de Ng (O'Dowd y col., 1994; Gibbs y col., 1996) los resultados de este grupo sugirieron que la participación de los astrocitos en la MLP era debido a funciones de mantenimiento (pasivas), tales como la regulación del pH, del K<sup>+</sup> extracelular, la recaptura de neurotransmisores, entre otras. A diferencia de este grupo, la amnesia producida por la aplicación de un inhibidor de los astrocitos (Figura 19C y Figura 20C) fue completamente revertida cuando se co-administra D-ser (Figura 20C) lo que sugiere fuertemente que es a través de la liberación de D-ser y no por funciones de sostén que los astrocitos están participando en la MLP. En concordancia con estos resultados, Zhang y col. (2008) encontraron que en presencia de MFA, la evocación de la memoria espacial se bloquea y que dicho efecto se revierte en su totalidad cuando se administra D-ser.

Estudios previos han reportado que la MLP evaluada en diversas tareas conductuales como la tarea de evitación inhibitoria, depende de la activación de los NMDARs (Roesler y col., 1998). Dichos receptores depende, entre otras cosas, de la presencia del agonista (glutamato) y del co-agonista (glicina o D-ser), para su activación (Thomson, 1990; Matsui y col., 1995). De esta manera, a través de la liberación de D-ser, los astrocitos pueden modular las respuestas de los NMDARs (Mothe y col., 2000). En este sentido, la concentración extracelular de D-ser basal es de 50  $\mu\text{M}$  (Hashimoto y col., 1995). Por lo que podemos inferir que la concentración de D-ser aplicada exógenamente en este trabajo (100  $\mu\text{M}$ ), puede estar siendo liberada en condiciones normales por los astrocitos de la región CA1 en el proceso de consolidación de la memoria.

VII.2 Participación de los astrocitos en la memoria facilitada por nicotina.

La mayoría de los trabajos enfocados en el estudio de la Nic sobre el aprendizaje y memoria administran la Nic directamente en el cerebro (tópico) o por vía sistémica pero con tratamientos prologados (crónicos). Sin embargo, los mecanismos de los efectos producidos por una única exposición de Nic a nivel sistémico no están bien caracterizados. En este sentido, el presente trabajo muestra que una sola administración de Nic (0.4 mg/kg, s.c.) es capaz de facilitar la consolidación de la memoria cuando se evalúa en la tarea de evitación inhibitoria (Figura 18C). Con esta dosis de Nic, se alcanza una concentración de aproximadamente 40 nM en el cerebro (Benowitz y Jacob, 1984; Levin, 2002; Lokitz y col., 2008). El metabolismo de la Nic en la rata y el humano son similares, por lo que el estudio en la rata de los efectos de la Nic son equiparables a lo que ocurriría en el humano (Levin, 2002). De esta manera, Lokitz y col. (2008) observaron que la concentración en el cerebro que se alcanza con un cigarro es de hasta 150 nM, por

De manera interesante, la aplicación única de D-ser no produjo efecto alguno en la MLP (Figura 20C), lo cual puede ser explicado de 2 maneras: 1) que los sitios de unión a D-ser se encuentran saturados en estas condiciones y 2) la activación de los NMDARs no puede ser mayor debido a que el glutamato disponible en la hendidura sináptica es poco, y a pesar de la gran cantidad de co-agonista presente, sin el glutamato, la activación de los NMDARs no se da.

La posible participación de otros gliotransmisores, así como los mecanismos por los cuales podrían estar participando no pueden ser descartados. Sin embargo, la importancia de la D-ser en la memoria ha sido estudiada desde 1994 por Ohno y col., aunque no explica el origen celular de la D-ser. Actualmente existe una controversia respecto a si las neuronas o los astrocitos son los principales responsables de la liberación de D-ser en la sinapsis. Sin embargo, en particular en la región CA1 del hipocampo, Yang y col. (2003) y Henneberger y col. (2010) muestran que son los astrocitos y no las neuronas los encargados de liberar D-ser y modular las respuestas mediadas por los NMDARs para la formación de la LTP.

lo que los efectos de la Nic reportados en este trabajo se obtendrían al fumar un cigarro.

De manera interesante, diversos trabajos han mostrado que el mecanismo de acción de la Nic está mediado por los nAChRs (Levin y col., 2002). En este sentido, Ramirez y col. (2004) mostraron que la facilitación de la MLP por la aplicación de Nic en la región CA1 del hipocampo en la tarea de evitación inhibitoria, es a través de la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$ . Además, se ha reportado que la activación de estos receptores por la Nic podría estar regulando las respuestas de los NMDARs (Levin y col., 1998; Ciamei y col., 2001). En este sentido, Ciamei y col. (2001) mostraron que el efecto facilitatorio de la Nic en la tarea de evitación inhibitoria depende de los NMDARs.

Nuestros resultados muestran por primera vez que la inhibición metabólica de los astrocitos es suficiente para abatir por completo el efecto facilitatorio de la Nic sobre la MLP (Figura 20C). Más aún, la D-ser fue capaz de restaurar en su totalidad la facilitación de la MLP (Figura 20C). Aún cuando no podemos descartar si las neuronas podrían estar respondiendo con liberación de D-ser por efecto de la Nic, diversos grupos han mostrado que los astrocitos son los principales elementos involucrados en la liberación de D-ser (Schell y col., 1995; Schell y col., 1997; Mothet y col., 2005).

El mecanismo por el cual la Nic puede estar produciendo la liberación de D-ser por parte de los astrocitos es desconocido. De esta manera proponemos dos mecanismos que pudieran estar participando en dicho efecto. El primero, sería un efecto directo de la Nic sobre los nAChRs presentes en los astrocitos y producir la liberación de D-ser y segundo, un efecto indirecto ya que el incremento de la liberación de glutamato por parte de la neurona presináptica producido por la Nic podría favorecer la liberación de D-ser por parte de los astrocitos.

Todos estos hallazgos en conjunto nos permiten sugerir que la participación de los NMDARs en la facilitación de la consolidación de la memoria por la Nic, se asegura por acciones presinápticas, por la liberación de glutamato; postsinápticas por un incremento en la excitabilidad neuronal; y finalmente sobre los astrocitos, por la liberación del co-agonista D-ser.

## VIII. CONCLUSIONES.

1. La administración aguda de nicotina a nivel sistémico facilita la consolidación de la memoria.
2. La D-serina liberada por los astrocitos de la región CA1 del hipocampo, participa en la consolidación de la memoria normal.
3. La D-serina liberada por los astrocitos de la región CA1 del hipocampo, participa en la consolidación de la memoria facilitada por nicotina.

## IX. BIBLIOGRAFIA.

- Abraham, W.C., Logan, B., Greenwood, J.M., Dragunow, M. 2002.** Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J. Neurosci.* 22, 9626 - 9634.
- Alberini, C.M., Ghirardi, M., Huang, Y.Y., Nguyen, P.V., Kandel, E.R. 1995.** A molecular switch for the consolidation of long-term memory: cAMP-inducible gene expression. *Ann. NY. Acad. Sci.* 758, 261 - 286.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rogers, S.W. 2009.** Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89, 73 - 120.
- Alger, B.E. y Teyler, T.J. 1976.** Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice. *Brain Research*, 110, 463 - 480.
- Andersen, P., Morris, P., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J. 2007.** The hippocampus book. Oxford University Press.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G. 1999.** Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neuroscience.* 22, 208 - 215.
- Bear, M.F. 1996.** A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13453 - 13459.
- Benowitz, N.L. y Jacob, P. III 1984.** Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther.* 35, 499 - 504.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzi, B.L., Pozzan, T., Volterra, A. 1998.** Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature.* 391, 281 - 285.
- Bliss, T.V. y Collingridge, G.L. 1993.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361, 31 - 39.
- Bliss, T.V. y 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.* 232, 331 - 356.
- Borroni, A.M., Fichtenholtz, H., Woodside, B.L., Teyler, T.J. 2000.** Role of voltage-

- dependent calcium channel long-term potentiation (LTP) and NMDA LTP in spatial memory. *J. Neurosci.* 20, 9272 - 9276.
- Bunsey, M.** y **Eichenbaum, H.** 1996. Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature.* 379, 255 - 257.
- Cenquizca, L.A.** y **Swanson, L.W.** 2007. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56(1), 1 - 26.
- Ciamei, A.**, **Aversano, M.**, **Cestari, V.**, **Castellano, C.** 2001. Effects of MK-801 and nicotine combinations on memory consolidation in CD1 mice. *Psychopharmacology.* 154, 126 - 130.
- Coco, S.**, **Calgari, F.**, **Pravettoni, E.**, **Pozzi, D.**, **Taverna, E.**, **Rosa, P.**, **Matteoli, M.**, **Verderio, C.** 2003. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J. Biol. Chem.* 278, 1354 - 1362.
- Collingridge, G.L.**, **Isaac, J.T.R.**, **Wang, Y.T.** 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience.* 5, 952 - 962.
- Cooke, S.F.** y **Bliss, T.V.** 2006. Plasticity in the human central nervous system. *Brain.* 129, 1659 - 1673.
- Dani, J.A.** y **Bertrand, D.** 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699 - 729.
- Davis, H.P.** y **Squire, L.R.** 1984. Protein synthesis and memory. *Psychol. Bull.* 96, 518 - 559.
- Davis, K.L.**, **Charney, D.**, **Coyle, J.T.**, **Nemeroff, C.** 2002. Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress. American College of Neuropsychopharmacology. 5ª Edición.
- Dudai, Y.** 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51 - 86.
- Eichenbaum, H.** 2001. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav. Brain Res.* 127, 199 - 207.
- Fabian-Fine, R.**, **Skehel, P.**, **Errington, M.L.**, **Davies, H.A.**, **Sher, E.** 2001. Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in

- rat hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7993 - 8003.
- Fellin, T., Pascual, O., Haydon, P.G. 2006.** Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology.* 21, 208 - 215.
- Fujii, S., Ji, Z., Morita, N., Sumikawa, K. 1999.** Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. *Brain Res.* 846(1), 137 - 143.
- Fujii, S., Ji, Z., Sumikawa, K. 2000.** Inactivation of  $\alpha 7$  ACh receptors and activation of non- $\alpha 7$  ACh receptors both contribute to long term potentiation induction in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience Letters.* 286, 134 - 138.
- Gibbs, M.E., O'Dowd, B.S., Hertz, L., Robinson, S.R., Sedman, G.L., Ng, K.T. 1996.** Inhibition of glutamine synthetase activity prevents memory consolidation. *Cognitive Brain Research.* 4, 57 - 64.
- Gómez Nicola, D. y Nieto Sampedro, M. 2008.** Glia reactiva. *Mente y Cerebro.* 32, 78 - 87.
- Good, M. y Honey, R.C. 1991.** Conditioning and contextual retrieval in hippocampal rats. *Behav. Neurosci.* 105(4), 499 - 509.
- Gothard, K.M., Skaggs, W.E., McNaughton, B.L. 1996.** Dynamics of mismatch correction in the hippocampal ensemble code for space: interaction between path integration and environmental cues. *J. Neurosci.* 16, 8027 - 8040.
- Gray, J.A. 1982.** The Neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. Oxford University Press. 1ª Edición.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G. 2006.** The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in Molecular Medicine.* 26, 536 - 542.
- Hashimoto, A., Oka, T., Nishikawa, T. 1995.** Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience.* 66, 635 - 643.
- Haydon, P.G. 2001.** Glia: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 185 - 193.
- Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., Rusakov, D.A. 2010.** Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature Letters.* 463, 232 - 237.
- Hernández-Morales, M. y García-Colunga, J. 2009.** Effects of nicotine on  $K^+$

- currents and nicotinic receptors in astrocytes of the hippocampal CA1 region. *Neuropharmacology*. 56, 975 - 983.
- Hiramatsu, M., Yamatsu, T., Kameyama, T., Nabeshima, T. 2002. Effects of repeated administration of (-) nicotine on AF64A-induced learning and memory impairment in rats. *J. Neurol. Transm.* 109, 361 - 375.
- Hukkanen, J., Peyton, J. III, Benowitz, N.L. 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol. Rev.* 57, 79 - 115.
- Ikeda, H. y Murase, K. 2004. Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.* 24, 9888 - 9896.
- ILAR. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. *Washington: National Academy Press*. p. 140.
- Ji, D., Lape, R., Dani, J.A. 2001. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*. 31, 131 - 141.
- Kandel, E.R. 1991. Principles of neuronal science. McGraw Hill. 4ª Edición.
- Kenny, P.J. y Markou, A. 2006. Nicotine self-administration acutely activates brain reward systems and induces a long-lasting increase in reward sensitivity. *Neuropsychopharmacology*. 31, 1203 - 1211.
- Laguer, G., Lebarry, F., Cormier, A. 2001. From nicotinic receptors to smoking dependence: therapeutic prospects. *Alcoologie et Addictologie*. 23, 39 - 42.
- Largo, C., Cuevas, P., Sonjen, G.G., Martín del Río, R., Herreras, O. 1996. The effect of depressing glial function in rat brain *in situ* on ion homeostasis, synaptic transmission, and neuron survival. *J. Neurosci.* 16(3), 1219 - 1229.
- Le Magueresse, C. y Cherubini, E. 2007. Presynaptic calcium stores contribute to nicotine-elicited potentiation of evoked synaptic transmission at CA3-CA1 connections in the neonatal rat hippocampus. *Hippocampus*. 17, 316 - 325.
- Levin, E.D. 2002. Nicotinic receptors in the nervous system. CRC Press. 1ª Edición.
- Levin, E.D. y Rose, J.E. 1990. Anticholinergic sensitivity following chronic nicotine administration as measured by radial-arm maze performance in rats. *Behav. Pharmacol.* 1(6), 511 - 520.
- Levin, E.D., Bettegowda, G., Weaver, T., Christopher, C. 1998. Nicotine-dizocilpine

interactions and working and reference memory performance of rats in the radial arm maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 61(3), 335 - 340.

Levin, E.D., McClernon, F.J., Rezvani, A.H. 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*. 184, 523 - 539.

Liu, Q., Zhang, J., Zhu, H., Qin, C., Chen, Q., Zhao, B. 2007. Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer disease model. *The FASEB Journal*. 21, 61 - 73.

Lokitz, S., Garg, P., Behm, F., Smith, H., Turkington, T., Herskovic, J., Garg, S., Mukhin, A., Rose, J. 2008. Dynamics of brain nicotine accumulation after inhalation of a single puff of cigarette smoke. *J. Nucl. Med.* 49, 132.

Lynch, M.A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 84, 87 - 136.

Matsui, T., Sekiguchi, M., Hashimoto, A., Tomita, U., Nishikawa, T., Wada, K. 1995. Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J. Neurochem.* 65(1), 454 - 458.

Mauch, D.H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Müller, E.C., Otto, A., Fritze, F.W. 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 294, 1354 - 1357.

McEwen, B.S. y Sapolsky, R.M. 1995. Stress and cognitive function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5(2), 205 - 216.

Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S., Baudry, M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *APS. Nature*. 319, 774 - 776.

Moser, E., Moser, M.B., Andersen, P. 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci.* 13, 3916 - 3925.

Mothe, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O. Jr., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., Snyder, S.H. 2000. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 4926 - 4931.

- Mothet, J.P., Pellegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., Baux, G.** 2005. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 5605 - 5611.
- Mustafa, A.K., Kim, P.M., Snyder, S.H.** 2004. D-Serine as a putative glial neurotransmitter. *Neuron Glia Biol.* 1, 275 - 281.
- Nedergaard, M., Ransom, B., Goldman, S.A.** 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 536 - 542.
- Newhouse, P., Potter, A., Corwin, J.** 1996. Effects of nicotinic cholinergic agents on cognitive functioning in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Drug Development Research.* 38, 278 - 289.
- Ninomiya, J.G.** 1991. *Fisiologia humana: Neurofisiologia.* Editorial El Manual Moderno.
- O'Dowd, B.S., Gibbs, M.E., Sedman, G.L., Ng, K.T.** 1994. Astrocytes implicated in the energizing of immediate memory processes in neonate chicks. *Cognitive Brain Research.* 2, 93 - 103.
- Ohno, M., Yamamoto, T., Watanabe, S.** 1994. Intrahippocampal administration of a glycine site antagonist impairs working memory performance of rats. *European Journal of Pharmacology.* 253, 183 - 187.
- Oikawa, H., Nakamichi, N., Kambe, Y., Ogura, M., Yoneda, Y.** 2005. An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. *J. Neurosci.* 25, 535 - 544.
- Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., Olliet, H.R.** 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell.* 125, 775 - 784.
- Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jettinija, K., Jettinija, S., Haydon, P.G.** 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signaling. *Nature.* 369, 744-747.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A., Sacktor, T.C.** 2006. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science.* 313, 1141 - 1144.
- Paxinos, G., Watson, C.** 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier.

Academic Press. 5ª Edición.

Peters, O.A., Palay, S.L., Webster, H. 1991. The fine structure of the nervous system. Oxford Univ. Press.

Pidoplichko, V.I., Noguchi, J., Areola, O.O., Liang, Y., Peterson, J. 2004. Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn. Mem.* 11, 60 - 69.

Polster, M.R., Nadel, L., Schacter, D.L. 1991. Cognitive neuroscience. Analysis of memory: A historical perspective. *J. Cog. Neurosci.* 3, 95 - 116.

Porter, J.T. y McCarthy, K.D. 1996. Hippocampal astrocytes *in situ* respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16, 5073 - 5081.

Ramírez, M.R., Barros, D.M., Dos Reis, E.A., Izquierdo, I. 2004. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience.* 126, 651 - 656.

Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M.L., Bermudez-Rattoni, M. 2001. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21, 7340 - 7348.

Rebolledo, F.A. 2002. Plasticidad cerebral. *Rev. Med. IMSS.* 41, 55 - 64.

Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570 - 577.

Roesler, R., Vianna, M., Sant'Anna, M.K., Kuyven, C.R., Kruei, A.V.S., Quevedo, J., Ferreira, M.B. 1998. Intrahippocampal infusion of the nmda receptor antagonist ap5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiology of learning and memory.* 69, 87 - 91.

Scheil, M.J., Brady, R.O. Jr., Molliver, M.E., Snyder, S.H. 1997. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J. Neurosci.* 17(5), 1604 - 1615.

Scheil, M.J., Molliver, M.E., Snyder, S.H. 1995. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 3948 - 3952.

- Smith, R.C., Singh, A., Infante, M., Khandat, A., Kloos, A. 2002.** Effects of cigarette smoking and nicotine nasal spray on psychiatric symptoms and cognition in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 27, 479 - 797.
- Smith, S.B. 2002.** Diabetic retinopathy and the NMDA receptor. *Drug News Perspect*. 15(4), 226.
- Socci, D.J., Sandberg, P.R., Arendash, G.W. 1995.** Nicotine enhances morris water maze performance of young and aged rats. *Neurobiology of Aging*. 16(5), 857 - 860.
- Stellwagen, D. y Malenka, R.C. 2006.** Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature*. 440, 1054 - 1059.
- Taubenfeld, S.M., Willig, K.A., Monti, B., Dolan, B., Pollonini, G., Alberini, C.M. 2001.** Formix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein  $\beta$  and  $\delta$  co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *The Journal of Neuroscience*. 21(1), 84 - 91.
- Thomson, A.M. 1990.** Glycine is a coagonist at the NMDA receptor/channel complex. *Prog. Neurobiol*. 35, 53.
- Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S. 1996.** The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 87, 1327 - 1338.
- Ventura, R. y Harris, K.M. 1999.** Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 19(16), 6897 - 6906.
- Verkhatsky, A., Orkand, R.K., Kettenmann, H. 1998.** Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev*. 78, 99 - 141.
- Wang, H. y Storm, D.R. 2005.**  $Ca^{2+}$ -stimulated adenylyl cyclases and hippocampal neuroplasticity. *Cellscience Reviews*. 2(1), 1 - 10.
- Waniewski, R.A. y Marti, D.L. 1998.** Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J. Neurosci*. 18(14), 5225 - 5233.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F. 2006.** Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 313, 1093 - 1097.
- Xiu, J., Norberg, A., Zhang, J.T., Guan, Z.Z. 2005.** Expression of nicotinic

- receptors on primary cultures of rat astrocytes and up-regulation of the  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits in response to nanomolar concentrations of the  $\beta$ -amyloid peptide 1 - 42. *Neurochemistry International*. 47(4), 281 - 290.
- Yamazaki, Y., Jia, Y., Hamaué, N., Sumikawa, K. 2005.** Nicotine-induced switch in the nicotinic cholinergic mechanisms of facilitation of long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci*. 22, 845 - 860.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S. 2003.** Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-Serine. *PNAS*. 100(25), 15194 - 15199.
- Zarei, M.M., Radcliffe, K.A., Chen, D., Patrick, J.W., Dani, J.A. 1999.** Distributions of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  and  $\beta 2$  subunits on culture hippocampal neurons. *Neuroscience*. 88, 755 - 764.
- Zhang, Z., Gong, N., Wang, W., Xu, L., Xu, T.L. 2008.** Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cerebral Cortex*. 1 - 11.
- Zoli, M., Lena, C., Picciotto, M.R., Changeux, J.P. 1998.** Identification of four classes of brain nicotinic receptors using  $\beta 2$  mutant mice. *J. Neurosci*. 18, 4461 - 4472.

**ANEXOS**

## ANEXO I. Farmacocinética y farmacodinamia de la nicotina.

La nicotina (Nic) se encuentra con mayor frecuencia en su forma enantiomérica levógira (-)-nicotina o (S)-nicotina; sólo de 0.1 - 0.6% del contenido total está en la forma dextrógira (+)-nicotina o (R)-nicotina (Gause, 1941). Su absorción depende tanto de su estado químico como de la vía de administración (Cuadro 2). Cuando es absorbida, la Nic entra al torrente sanguíneo y es rápidamente distribuida a diferentes tejidos, donde tiene mayor afinidad al hígado, los riñones, el bazo, los pulmones y el cerebro (Benwell y col., 1988; Urakawa y col., 1994). El tiempo en que llega y permanece en el cerebro, así como en otros órganos, depende de la vía de administración y la dosis. El tiempo promedio en que la Nic alcanza el cerebro después de haber sido administrada es de 10 - 20 s. La vida media de la Nic después de haber sido administrada es de aproximadamente 2 horas (Hukkanen, 2005).

Cuadro 2. Farmacocinética de la nicotina. Modificado de Hukkanen, 2005.

Farmacocinética de la absorción de diferentes formas de administración de nicotina en dosis agudas.	
Tipo de administración de nicotina	Biodisponibilidad
$C_{max}^a$	$T_{max}^{a,b}$
ng/ml	min
Fumar (1 cigarro, 5 min)	80-90 (de nicotina inhalada)
15-30 (venas)	5-8 (venas)
20-60 (arterial)	3-5 (arterial)
Intravenosa ~5.1 mg (60 µg/kg, 30 min)	30 (venas)
30 (venas)	30 (venas)
50 (arterial)	30 (arterial)
5-8 (venas)	11-18 (venas)
10-15 (intravenosa)	4-6 (arterial)
Inyección subcutánea	100
15	25
Solución oral	20
2 mg	66
~3.0 mg (45 µg/kg)	51
	2.9

<sup>a</sup> Los valores de  $C_{max}$  y  $T_{max}$  son de venas en la periferia.

<sup>b</sup> Los valores de  $T_{max}$  son medidos desde el inicio de la administración.

<sup>c</sup> La dosis estimada de 2 mg de nicotina por cigarro es más alta que la usual (1 a 1.5 mg).

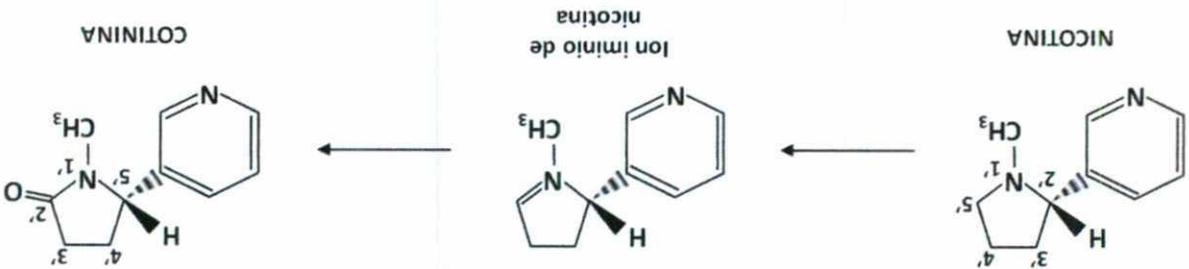
se expresa en mamíferos) y del  $\beta 2$  -  $\beta 4$  (Andersen y col., 2007). subunidades de los nAChRs en el SNC. Estos comprenden del  $\alpha 2$  -  $\alpha 10$  (el  $\alpha 8$  no momento, se han identificado once subtipos de genes que codifican para las compuestos por cinco subunidades  $\alpha$  (Albuquerque y col., 2009). Hasta el heteroméricos- (Figura 22D), sin embargo existen receptores monoméricos -

Generalmente están conformados por dos subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$  - extracelulares y el puente bisulfuro (Figura 22B). en la interfase que se encuentra entre las subunidades en los dominios secuencia altamente conservada de 13 aminoácidos (Figura 22A). La Nic se une bisulfuro característico, que se encuentra entre dos cisteínas separadas por una pentaméricas alrededor de un poro central (Figura 22C y D). Poseen un puente Están compuestos de cinco subunidades que forman estructuras aminobutírico tipo A, glicina y de serotonina tipo 3 (Albuquerque y col., 2009).

Los nAChRs pertenecen a la superfamilia de canales iónicos regulados por ligandos llamada "proteínas Cys-loop", que incluyen a los receptores del ácido y- ligandos llamada "proteínas Cys-loop", que incluyen a los receptores del ácido y-

#### 1.1 Receptores de acetilcolina de tipo nicotínicos.

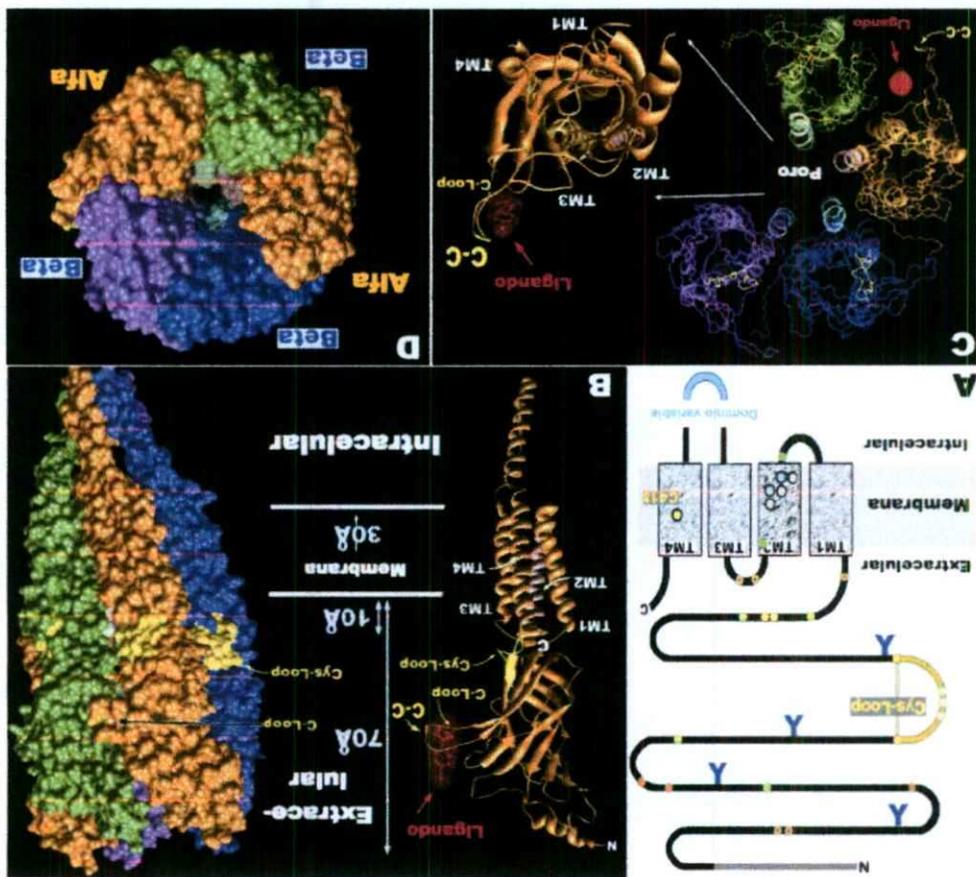
Figura 21. Oxidación de la nicotina en (S)-cotinina ( $C_{10}H_{12}N_2O$ ). Nombre IUPAC de la cotinina: 1-metil-3-(2-piridinil)-2-pirrolidiona. Modificado de Hukkanen, 2005.



La Nic se metaboliza en el hígado por medio del grupo de enzimas (de la familia del citocromo P450) encargadas del metabolismo de xenobióticos en el organismo. En el humano el 70 - 80% de la Nic es metabolizada por la enzima CYP2A6, que la oxida y transforma en el metabolito cuantitativamente más importante: la cotinina (Figura 21), que es posteriormente metabolizada por los riñones y excretada en la orina (Hukkanen, 2005).

En el hipocampo, los nAChRs más expresados son  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ , y  $\alpha 7$  (Zoli y col., 1998; Fabian-Fine y col., 2001). Estos receptores se localizan en las neuronas presinápticas en los axones, así como en las neuronas postsinápticas, principalmente en las dendritas (Zarei y col., 1999). Los receptores  $\alpha 7$  son altamente permeables a  $Ca^{2+}$ , mientras que los  $\alpha 4\beta 2$  son mayormente permeables a  $Na^+$  y potasio ( $K^+$ ). Estos últimos son los receptores con mayor afinidad a la Nic (Andersen y col., 2007).

Figura 21. Estructura básica de los nAChRs. A, se muestra la secuencia lineal de todas las subunidades de los nAChRs, los sitios transmembranales (TM1 - TM4), el puente disulfuro (Cys-Loop) y un sitio intracelular de dominio variable. B, modelo tridimensional donde se observa las 4 partes transmembranales (TM1-TM4) y el sitio extracelular donde se une el ligando. C, ubicación del poro central y el sitio de unión al ligando en la conformación pentamérica del receptor. D, ejemplo de un receptor heteromérico, conformado por dos subunidades  $\alpha$  y tres  $\beta$ .



Albuquerque, E.X.; Alkondon, M.; Pereira, E.F.R.; Castro, N.G.; Schratzenholz, A.; Barbosa, O.T.F.; Bonfante-Cabarcas, R.; Aracava, Y.; Eisenberg, H.M.; Maelicke, A. 1997. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *JPET*. 280, 1117 - 1136.

Albuquerque, E.X.; Pereira, E.F.R.; Alkondon, M.; Rogers, S.W. 2009.

## 1.2 Bibliografía.

Tipos de nAChRs	Células que expresan nAChRs	Acciones	Agonistas	Antagonistas	Referencias
$\alpha 7$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Piramidales.</li> <li>▪ Interneuronas.</li> <li>▪ Astrocitos.</li> <li>▪ Granulares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Potenciación pre y postsináptica inducida por la entrada de <math>Ca^{2+}</math>.</li> <li>▪ Modulación de las sinapsis de GABA y glutamato.</li> <li>▪ Activación de las cascadas de CaMKII y MAPK.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ACh.</li> <li>▪ Colina.</li> <li>▪ Nicotina.*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ MLA.</li> <li>▪ <math>\alpha</math>-BGT.</li> </ul>	Alkondon y col., 1999; Alkondon y col., 2000a; Alkondon y col., 2000b; Xiu y Andersen y col., 2005; Andersen y col., 2007.
$\alpha 4\beta 2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Piramidales.</li> <li>▪ Interneuronas.</li> <li>▪ Astrocitos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Potenciación pre y postsináptica inducida por la entrada de <math>Na^+</math> y <math>K^+</math>.</li> <li>▪ Modulación de las sinapsis de glutamato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ACh.</li> <li>▪ Cisteína.*</li> <li>▪ Nicotina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DH<math>\beta</math>E.</li> </ul>	Alkondon y col., 1993; Albuquerque, y col., 1997; Gahrng y col., 2004a; Xiu y Andersen y col., 2005; Andersen y col., 2007.
$\alpha 3\beta 4$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Interneuronas.</li> <li>▪ Astrocitos.</li> <li>▪ Neuronas de la médula ósea.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Modulación de las sinapsis de GABA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cisteína.</li> <li>▪ Colina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ MEC.</li> </ul>	Alkondon y col., 1997; Gahrng y col., 2004a; Gahrng y col., 2004b; Albuquerque, 2009.

Cuadro 3. Propiedades de los nAChRs. \*, agonistas parciales. CaMKII, calcio-calmodulina quinasa II; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; ACh, acetilcolina; MLA, metillicaconitina;  $\alpha$ -BGT,  $\alpha$ -bungarotina; DH $\beta$ E, Dihidro- $\beta$ -eritroidina; MEC, mecamelamina.

3- (Albuquerque y col., 2009).

A pesar de que la unión del ligando (acetilcolina o Nic) está asociado con las subunidades  $\alpha$ , es la combinación de diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que constituyen las propiedades de dicho receptor, tales como: agonistas, antagonistas, especificidad, permeabilidad iónica y localización subcelular -Cuadro

Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89, 73 - 120.

**Alkondon, M.; Albuquerque, E.X. 1993.** Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 1455 - 1473.

**Alkondon, M.; Pereira, E.F.R.; Almeida, L.E.; Randall, W.R. Albuquerque, E.X. 2000a.** Nicotine at concentrations found in cigarette smokers activates and desensitizes nicotinic acetylcholine receptors in CA1 interneurons of rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 39, 2726 - 2739.

**Alkondon, M.; Pereira, E.F.R.; Cortes, W.S.; Maelicke, A.; Albuquerque, E.X. 1997.** Choline is a selective agonist of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2734 - 2742.

**Alkondon, M.; Pereira, E.F.R.; Eisenberg, H.M.; Albuquerque, E.X. 1999.** Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 19, 2693 - 2705.

**Alkondon, M.; Pereira, E.F.R.; Eisenberg, H.M.; Albuquerque, E.X. 2000b.** Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks. *J. Neurosci.* 20, 66 - 75.

**Andersen, P.; Morris, P.; Amaral, D.; Bliss, T.; O'Keefe, J. 2007.** The hippocampus book. Oxford University Press.

**Benwell, M.E.; Balfour, D.J.; Anderson, J.M. 1988.** Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[ $^3$ H]nicotine binding sites in human brain. *J. Neurochem.* 50, 1243 - 1247.

**Dani, J.A. y Bertrand, D. 2007.** Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699 - 729.

**Fabian-Fine, R.; Skehel, P.; Errington, M.L.; Davies, H.A.; Sher, E. 2001.** Ultrastructural distribution of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7993 - 8003.

**Gahring, L.C.; Persyanov, K.; Dunn, D.; Weiss, R.; Meyer, E.L.; Rogers, S.W.**

- 2004a. Mouse strain-specific nicotinic acetylcholine receptor expression by inhibitory interneurons and astrocytes in the dorsal hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*. 468, 334 - 346.
- Gahring, L.C.; Persyanov, K.; Rogers, S.W. 2004b. Neuronal and astrocyte expression of nicotinic receptor subunit  $\beta 4$  in the adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 468, 322 - 333.
- Gause, G.F. 1941. Optical activity and living matter. Editorial Normandy, Missouri: Biodynamica.
- Hukkanen, J.; Peyton, J. III, Benowitz, N.L. 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol. Rev.* 57, 79 - 115.
- Urakawa, N.; Nagata, T.; Kudo, K.; Kimura, K.; Imamura, T. 1994. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in various human tissues using capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Int. J. Legal Med.* 106, 232 - 236.
- Zarei, M.M.; Radcliffe, K.A.; Chen, D.; Patrick, J.W.; Dani, J.A. 1999. Distributions of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  and  $\beta 2$  subunits on culture hippocampal neurons. *Neuroscience*. 88, 755 - 764.
- Zoll, M.; Lena, C.; Picciotto, M.R.; Changeux, J.P. 1998. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using  $\beta 2$  mutant mice. *J. Neurosci.* 18, 4461 - 4472.

ANEXO II. Abreviaturas.

<b>AMPARS</b>	Receptores ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico.
<b>AP5</b>	2-amino-5-fosfonopentanoico.
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato.
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio.
<b>CaMKII</b>	Calcio-calmodulina quinasa II.
<b>CAMP</b>	Adenosina monofosfato cíclico.
<b>CYP2A6</b>	Citocromo P450, familia 2, subfamilia A, polipéptido 6.
<b>DAAO</b>	D-aminoácido oxidasa.
<b>DCKA</b>	Ácido 5,7-dicloroquinurénico.
<b>D-ser</b>	D-serina.
<b>GFAP</b>	Proteína ácido glial fibrilar.
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry nomenclature.
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio.
<b>LTP</b>	Potenciación de largo plazo.
<b>MCP</b>	Memoria de corto plazo.
<b>MFA</b>	Monofluoroacetato de sodio.
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesio.
<b>MLP</b>	Memoria de largo plazo.
<b>MSO</b>	Metionina sulfoximina.
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio.
<b>nAChRs</b>	Receptores de acetilcolina de tipo nicotínicos.
<b>Nic</b>	Nicotina.
<b>NMDARs</b>	Receptores N-metil-D-aspartato.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico.
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central.