



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



400 AÑOS
UNC | Universidad
Nacional de Córdoba



Universidad
Nacional
de Córdoba



***“PAPEL DE GRELINA EN LA
MODULACIÓN DE LA MEMORIA EN
HIPOCAMPO”.***

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Bioquímica Marisa Soledad Gherzi

IFEC-CONICET

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

ARGENTINA

-2016-

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Susana Rubiales de Barioglio.

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS

Dra. Mariela Perez

Dra. Marta Hallak

Dr. Juan Carlos Molina

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Mario Perelló

El presente trabajo de tesis ha sido realizado en el Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC) perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, de acuerdo a la reglamentación vigente en dicha facultad para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Para la realización de este trabajo la autora contó con una beca Doctoral en el área de Neurociencias de la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (SECyT/ANPCyT) 2009-2013, (en el marco del Programa "Proyectos de Fortalecimiento de Capacidades en Recursos Humanos en Áreas Prioritarias) y una beca de posgrado tipo II del CONICET 2013-2015, además del apoyo financiero de subsidios otorgados por SECyT-UNC, MinCyT-Córdoba y CONICET.

La tesista cumplimentó con los cursos requeridos y realizó actividades docentes en las asignaturas Anatomía, Fisiología y Fisiopatología Humana I, de la carrera de Farmacia, y Fisiología Humana, de la carrera de Bioquímica, contando para ello con un cargo de Profesor Asistente (dedicación simple) obtenido por concurso.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”.

Marie Curie

A mis padres, Albina y Alcides

A mi gran amor, Dani

A mi hijo, Pedrito

AGRADECIMIENTOS

*Al **Departamento de Farmacología**, por brindarme el espacio y el equipamiento para el desarrollo de este trabajo de investigación.*

*A la Secretaria de Ciencia y Tecnología conjuntamente con la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (**SECyT/ANPCyT**), y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (**CONICET**), por otorgarme el apoyo económico para la realización de esta tesis.*

*A los miembros de mi comisión de tesis, **Dra. Mariela Perez, Dra. Marta Hallak y Dr. Juan Carlos Molina**, por su respeto y trato para conmigo, sus valiosos aportes, críticas y sugerencias durante la realización de esta tesis doctoral.*

*Al **Dr. Perello**, por dedicar tiempo a la revisión de esta tesis como evaluador externo.*

*A **Susan**, mi directora, por guiarme en mi formación profesional y en mi crecimiento personal, por su apoyo, su calidez humana, su confianza y por la libertad otorgada en cada una de mis decisiones. Gracias por ser tan bondadosa y buena persona...*

*A **todos los profesores de Farmaco**, especialmente a **Mariela**, por sus consejos y sus comentarios, por guiarme y responder a mis inquietudes científicas, por contribuir a mi crecimiento profesional.*

*A **Este y Lore**, por su ayuda incondicional, sus consejos, su interés y predisposición para la realización y diseño de experimentos, por su gran cariño. A Gladiola por esperarnos cada mañana con una sonrisa y el cafecito calentito. Y obviamente gracias a las 3 por compartir nuestro pequeño mundo del box 2.*

*A **Silvi secre y María José**, por la enorme predisposición y colaboración en lo que respecta a los asuntos administrativos, gracias, gracias por perseguirnos para rellenar formularios, firmar hojas, y otras tantas cosas, ino sé qué sería de nuestra vida sin ustedes dos!. Y además de todo eso, por su paciencia y su cariño, son personitas maravillosas...*

*A **Yani, Nico y Javi**, por su asistencia en cuestiones relacionadas al bioterio y por su gran humor, que me ha sacado más de una sonrisa dentro del bioterio cuando tenía más ganas de llorar que de reír, después de salir de la pieza de conducta...*

A las profes de Fisio, **Gra, Moni, Jime, Eli, Aldana, Iva, Pato y Flor**, por su compañerismo, su buena onda, por todo lo vivido a lo largo de estos años.

A mis compañeros de Farmaco, a los que ya se fueron: **Caro M, Coti ruli, Marian, Sol, Sami, Leandro, Eve y Noe**, a los que están: **Fla, Betha, Cristian, Romi, Dai, Pau Avalos, Ceci, Negra, Emi, Pau Albrecht, Martín, Guada, Andre, Vane** y en especial a **Nati** por su gran ayuda con los cálculos estadísticos y a **Luz** por tu paciencia, predisposición y por recibirme siempre con una sonrisa; y a los que conocí en el camino **Ale V y Marcos** (Química Biológica) y en mis viajes “académicos”: **Carla, Seba C, Seba G, Fer** (Mendoza), **Vivi, Dani y Mauricio**, (Florianópolis), **Mathieu, Nuri, Pepe y Pere** (Barcelona), **Fer, Queli y demás chicos del LabNeuro** (Santa María), gracias a todos por generar un hermoso ambiente de trabajo, de compañerismo, por el cariño, por su alegría, por muchas charlas, salidas, comilonas y tantos hermosos momentos compartidos.

A **Pablo** (mi profe de guitarra -perdón por abandonar-) y Fabri “**el chiquito**” porque mis días no hubieran sido lo mismo sin sus ocurrencias y chistes “malos”, gracias por tantas risas y sonrisas...

A **Lau D, Iva y Pato** por su complicidad, sus consejos, su apoyo incondicional, por todas las charlas y debates en el box 2, por llenarme de energía y alegría, por siempre “estar”...¡Las adoro amigas!

A mis compañeras de “La Virgencita”: **Silvi (la loca Bustos), Este, Coti P y Mara**, por la gran experiencia compartida, por momentos únicos, tan emocionantes y mágicos...**Silvi** gracias por tu infinita ayuda, por ser tan ‘madraza’ conmigo... Y a “**mi Virgencita**” por escuchar siempre mis peticiones, por ayudarme y cuidarme...¡Gracias, gracias y mil gracias!

A **Lau G, Ale y Pato** por acompañarme en un viaje increíble, un sueño hecho realidad... por ser mis compañeras de aventura en el viejo mundo.

A “mi colorada”, **Flor**, cuantas cosas hemos pasado amiga mía, como agradecerte por todo lo que me has enseñado, por todo tu cariño, por tu paciencia infinita, por aguantarme (y mucho), por estar siempre presente en mi vida, por cruzarte en mi camino...¡Te quiero tanto amiga!

A las “Shigas” de Brk: **Vale, Anitus, Lely, Picu, Cari, Gringa y Noe**, por tantos años de amistad, por bancarme en todas, por alentarme, acompañarme y compartir todos los

momentos importantes de mi vida. A mi **Gringa** especialmente gracias, por ser mi compañera concubina en los inicios de esta tesis, y a **Noe** también por haber aceptado ser la niñera de Pedro, inunca podría haber estado más tranquila que dejando a mi bebé con vos amiga!. A **Mariano** por su asistencia en diseño gráfico, y por su predisposición para ayudarme en todo lo que le pido, gracias rubio!.

A mis padres, **Albina y Alcides**, y hermanos, **Lore y Diego**, por su amor incondicional, por su apoyo en cada cosa que emprendo, por alentarme, por respetar y acompañarme en cada una de mis decisiones, por inculcarme valores, por estar siempre a mi lado... ¡Los amo!

A mis suegros, **Estela y Juan**, mis cuñados, "**la**" **Ale** y "**el**" **Ale**, y sobrinos, **Emi, Lucho, Iri y Luli**, por su cariño, sus rezos, por apoyarme siempre...¡Los quiero!

A **Dani**, "mi gran amor", por tu infinita paciencia, por ser mi compañero de camino, por acompañarme en los momentos más tristes y más felices de mi vida, por tus consejos alentadores, por cuidar de Pedrito (con todo lo que ello implica) para que yo pudiera escribir esta tesis, por hacerme tan inmensamente feliz...

A **Pedro**, por enseñarme a valorar que las cosas importantes de la vida se encuentran en la sencillez de lo cotidiano. Gracias bebé por cada una de tus sonrisas y miradas de amor puro, por elegirme y enseñarme a ser mamá y a descubrir un mundo totalmente diferente...

A **Marisa**, por su perseverancia, por luchar siempre por sus convicciones, por creer que todo en la vida pasa por algo, por levantarse después de cada caída...

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron o participaron en la realización de esta tesis, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

"Cada persona que pasa por nuestra vida es única.

Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros.

Habrà los que se llevarán mucho, pero no habrá de los que no nos dejarán nada.

Esta es prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad."

Jorge Luis Borges.

En las últimas décadas se ha ido produciendo una transición en los hábitos alimentarios generando sobreconsumo. La dieta tradicional ha sido reemplazada por alimentos baratos, procesados y fácilmente accesibles, ricos en carbohidratos refinados, grasas animales y aceites comestibles, que han resultado en un incremento de individuos con sobrepeso a nivel mundial. Mientras se convierte en una enfermedad epidémica en todo el mundo, la obesidad también empieza a dar señales de alerta en nuestro país. Lo corroboró la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2005-2009, realizada por el Ministerio Nacional de Salud que muestra que más de la mitad de la población argentina -exactamente el 53,4%- tiene exceso de peso (sobrepeso y obesidad).

El sobrepeso incrementa los riesgos de desarrollar una serie de patologías tales como síndrome metabólico, diabetes, trastornos cognitivos y enfermedad de Alzheimer (EA). La EA representa la causa más común de demencia, acaparando entre un 60% y un 70% de los casos. La misma, es un trastorno neurodegenerativo crónico, que afecta en forma progresiva la memoria, la conducta, otras funciones cognitivas (como el lenguaje) e impacta en la vida diaria de los pacientes y sus familias.

Con el aumento de la expectativa de vida, se estima que en Latinoamérica la cantidad de personas con EA aumentará más de 300% en los próximos 20 años. La incidencia anual de demencia en Latinoamérica es de 9,2 casos por cada mil habitantes, y se calcula que afecta en la actualidad a más de 400 mil argentinos. Es por ello que suele referirse a los trastornos cognitivos y a las demencias como 'la nueva epidemia', con importantes consecuencias a nivel sanitario y económico. Después de 100 años desde el descubrimiento de la enfermedad todavía se está luchando para encontrar una cura.*

En ese sentido, existe gran interés en desarrollar drogas efectivas que modifiquen la biología de la enfermedad y/o mejoren los síntomas. Por otra parte, ha sido demostrado que las hormonas relacionadas con la homeostasis de la glucosa, el control del balance energético y la ingesta, tales como leptina, grelina, insulina, GLP-1, ejercen múltiples acciones a nivel del sistema nervioso central, entre ellas en la fisiología del hipocampo,

afectando la plasticidad estructural y en consecuencia las funciones cognitivas tales como aprendizaje y memoria.

Nuestro grupo de trabajo inició sus investigaciones con la finalidad de aportar nuevos conocimientos relacionados a la fisiología de la hormona grelina, referidos a la ingesta, ansiedad y memoria. En la actualidad, y después de 14 años en el tema, este trabajo de tesis doctoral se centra particularmente en los efectos de grelina a nivel hipocampal, con el objetivo de aportar nuevos elementos para la comprensión de el/los mecanismos por el/los cual/es esta hormona facilita la memoria, de manera que este conocimiento básico pueda contribuir a desarrollar nuevas estrategias y/o fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.



Dra. Susana Rubiales de Barioglio.

**The World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. Alzheimer's Disease International (ADI).*

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRUDUCCIÓN	4
GRELINA	5
<i>Estructura, síntesis y secreción de Grelina</i>	6
<i>Receptor de Grelina: estructura y localización</i>	14
<i>Efectos biológicos de Grelina</i>	18
APRENDIZAJE Y MEMORIA	20
TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA: <i>paradigma comportamental</i> <i>utilizado</i>	29
PARTICIPACIÓN DE GRELINA EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA	35
SEROTONINA Y GRELINA	40
OBJETIVOS	42
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
ANIMALES	46
CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	47
MICROINYECCIÓN INTRACEREBRAL	48
ANÁLISIS HISTOLÓGICO	48
DROGAS	50
ADMINISTRACIÓN	50
PURIFICACIÓN DE SINAPTOSOMAS	50

ENSAYO DE LIBERACIÓN DE GLUTAMATO	52
PRUEBA DE EVITACIÓN INHIBITORIA: Step Down Test (SDT)	53
ELECTROFISIOLOGÍA	55
INMUNOHISTOQUÍMICA	57
CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS-NR2B	58
ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN HIPOCAMPO POR SUPERFUSIÓN	59
RESULTADOS	63
OBJETIVO ESPECÍFICO I. <i>Determinar si el efecto potenciador de Gr sobre la retención de la memoria implica la modulación del proceso de consolidación: ventana temporal de dicho efecto</i>	64
OBJETIVO ESPECÍFICO II. <i>Investigar si los efectos inducidos por el péptido sobre la retención de la memoria y sobre la plasticidad sináptica son dependientes de la activación de su receptor específico (GHS-R1A)</i>	67
OBJETIVO ESPECÍFICO III. <i>Determinar el efecto de Gr sobre la liberación de glutamato endógeno evocado por 4-AP a partir de sinaptosomas hipocampales</i>	72
OBJETIVO ESPECÍFICO IV. <i>Investigar el efecto de la administración del péptido sobre la expresión de la subunidad NR2B de los RNMDA, y sobre los efectos conductuales y electrofisiológicos en animales pretratados con un antagonista de la subunidad NR2B, Ro 25-6981</i>	74
OBJETIVO ESPECÍFICO V. <i>Determinar el efecto de Gr sobre la liberación de [³H]5-HT de rebanadas de hipocampo</i>	82
DISCUSIÓN	86
BIBLIOGRAFÍA	98
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	123

ABREVIATURAS

Aa: aminoácidos

ACTH: hormona adrenocorticotropa

AgRP: proteína relacionada con el gen Aguti

AMPc -del inglés- cyclic adenosine monophosphate: adenosin monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de la varianza

ARC: núcleo arcuato

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AUC: área bajo la curva

BHE: barrera hematoencefálica

Ca²⁺: calcio

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular

CaMKII: proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II

CREB: proteína de unión al elemento que responde a AMPc

DG: giro dentado

EPSP: -del inglés- field Excitatory Post-Synaptic Potentials: potenciales post-sinápticos excitatorios de campo

ER: retículo endoplasmático

ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares

GH: hormona de crecimiento

GHRH: hormona liberadora de GH

GHRH-R: receptor de GHRH

GHS: secretagogos de la hormona de crecimiento

GHS-R: receptor específico para GHS

GHS-R1a: receptor para secretagogos de la hormona de crecimiento tipo 1a

GHS-R1b: receptor para secretagogos de la hormona de crecimiento tipo 1b

GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1

GMPC: guanosín monofosfato cíclico

GOAT: O-aciltransferasa de grelina

GPCR: receptor acoplado a proteína G

Gr: Grelina

icv: intracerebroventricular

IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo 1

ip: intraperitoneal

IP₃: inositol trifosfato

JNK: quinasa N-terminal c-Jun

LTM: lóbulo temporal medial

LTP -del inglés- Long Term Potentiation: potenciación a largo plazo

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MBOATs: O-aciltransferasas unidas a membrana

MCP: memoria a corto plazo

MLP: memoria a largo plazo

NDR: núcleo dorsal del rafe

NO -del inglés- nitric oxide: óxido nítrico

NOS -del inglés- nitric oxide synthase: óxido nítrico sintasa

NPY: Neuropeptido Y

NR2B-IR: células inmunorreactivas NR2B

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

POMC: proopiomelanocortina

RAMPA: receptor ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

RNMDA: receptor N-metil D-aspartato

5-HT: serotonina

SDT -del inglés-Step Down Test: prueba de descenso del escalón.

SNC: sistema nervioso central

SSRI: inhibidores de la recaptación de serotonina

TM: transmembrana



RESUMEN

Este trabajo de tesis tiene como objetivo contribuir al conocimiento de las bases neurobiológicas de los efectos de Gr a nivel del sistema nervioso central, particularmente en hipocampo, investigando el/los posibles mecanismos implicados en la modulación de la retención de la memoria. Estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado que Gr incrementa la retención de la memoria y la ingesta de alimentos cuando se administra localmente en esta estructura. Además, los efectos de Gr sobre la memoria se correlacionan con parámetros tales como el incremento en la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), con la disponibilidad del neurotransmisor serotonina (5-HT) y con la disminución del umbral para generar potenciación a largo plazo (LTP).

Los experimentos de esta tesis incluyen el estudio de los posibles mediadores de la cadena bioquímica de la memoria modulados por Gr, como así también, la participación de neurotransmisores en los efectos del péptido, utilizando paradigmas conductuales, determinaciones bioquímicas y electrofisiológicas, bloqueo farmacológico de receptores y técnicas inmunohistoquímicas, a fin de definir el papel funcional de Gr sobre la memoria. Más específicamente, estudiamos si los efectos de la administración intrahipocampal de Gr sobre la memoria, dependen de la activación de su receptor específico GHS-R1a, de modificaciones en la liberación de glutamato y/o de la expresión de sus receptores, con particular atención en la subunidad NR2B del receptor NMDA. Analizamos también, si Gr modifica la liberación del neurotransmisor 5-HT y si ello se correlaciona con el incremento en la retención de la memoria.

Los resultados mostraron que Gr facilita la consolidación de la memoria evaluada en una prueba de evitación inhibitoria (SDT), ejerciendo sus efectos en una ventana temporal determinada, es decir, sólo cuando es infundida inmediatamente y no a los 15 o 60 min después del entrenamiento. Se demostró también, que los efectos de Gr sobre el comportamiento y los parámetros electrofisiológicos desaparecen cuando se infunde en hipocampo un antagonista selectivo del receptor de Gr, D-Lys3-GHRP-6, previo a la infusión del péptido, indicando que los efectos observados son mediados por la activación directa del receptor de Gr (GHS-R1a) en esta estructura. En lo que a liberación de

glutamato se refiere, la administración de Gr incrementa la liberación evocada de glutamato a partir de sinaptosomas hipocampales, de una manera dependiente de la dosis. En cuanto al efecto de la administración intrahipocampal de Gr sobre la expresión de la subunidad NR2B del RNMDA, el péptido incrementa el número de células inmunorreactivas-NR2B en las áreas hipocampales CA1 y DG. Con el fin de agregar información funcional sobre la participación de la subunidad NR2B del RNMDA en los efectos de Gr, se estudiaron los efectos comportamentales y electrofisiológicos del péptido en animales previamente infundidos con el antagonista específico de la subunidad NR2B, Ro 25-6981. Cuando Gr se infundió en estos animales, que presentan un deterioro en la retención de la memoria, los valores obtenidos para el tiempo de latencia alcanzan valores similares a los del grupo control, sugiriendo que Gr es capaz de revertir el efecto deletéreo del antagonista sobre la retención de la memoria. Con respecto a los parámetros electrofisiológicos, cuando Gr se infundió en animales pretratados con Ro 25-6981, en los cuales no puede generarse LTP, los valores de umbral para inducir este fenómeno aumentaron en comparación con el grupo Gr, pero fueron significativamente más bajos que los del grupo salina.

Resultados previos en el laboratorio, sugirieron que los efectos de Gr dependerían de la disponibilidad de 5-HT. En consecuencia valoramos la liberación de 5-HT a partir de rebanadas de hipocampo, demostrándose que Gr inhibe la liberación de $[^3H]5-HT$. Esta disminución en la liberación de 5-HT se correlaciona con un mayor tiempo de latencia en el SDT (indicativo de retención de la memoria).

En conclusión, estos resultados refuerzan la hipótesis de que Gr podría modular los primeros eventos de la consolidación de la memoria en hipocampo, probablemente mediante el aumento de los niveles de $[Ca^{+2}]_i$ inducido por la activación de sus receptores GHS-R1a, el incremento en la liberación de glutamato, la activación de los RNMDA con un aumento de la expresión de la subunidad NR2B, estimulando de esta manera diferentes vías moleculares que contribuyen a la facilitación en la retención de la memoria y a la inducción de LTP.



INTRODUCCIÓN

GRELINA

La Grelina es una hormona peptídica, descubierta en el año 1999 por el grupo de Kojima (Kojima et al. 1999). El estudio de esta hormona comienza a partir de la investigación farmacológica referida a los secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS), en la cual descubrieron una serie de péptidos sintéticos capaces de provocar la liberación de la hormona de crecimiento (GH) de cultivo de células de hipófisis de rata. El mecanismo de señalización intracelular utilizado por estos secretagogos demostró ser diferente al utilizado por su liberador fisiológico, la hormona liberadora de GH (GHRH), lo cual sugería la existencia de un receptor diferente (Momany F et al. 1981; Bowers C 1998; 2001). Así el término más apropiado para describir la forma en la que Gr fue descubierta es el de "farmacología inversa", ya que el descubrimiento de su receptor y los efectos intracelulares precedieron por varios años al descubrimiento y aislamiento de este nuevo péptido (Horvath T et al. 2001; de Ambrogi M et al. 2003).

El descubrimiento y clonación del receptor específico para GHS (GHS-R) en hipófisis anterior e hipotálamo data de 1996. Este hecho, como así también la evidencia de que la estimulación de este receptor activaba una vía intracelular diferente a la vía de la proteína quinasa A (PKA)- adenosin monofosfato cíclico (AMP_c) inducida por GHRH, sugirió la posibilidad de la existencia de un ligando endógeno para este receptor (Howard A et al. 1996). Así en el año 1999, el grupo de Kojima, purificó un producto natural, a partir de estómago de rata, capaz de unirse específicamente a GHS-R, estimulando la liberación de GH e induciendo un incremento de la ingesta de alimentos (Kojima M et al. 1999). Surge así el nombre Grelina (Gr) o Ghrelin, de origen Indo-Europeo, que se origina del prefijo "ghre", el cual significa crecimiento y "relin" que se refiere a su actividad como liberadora de GH (Figura 1).

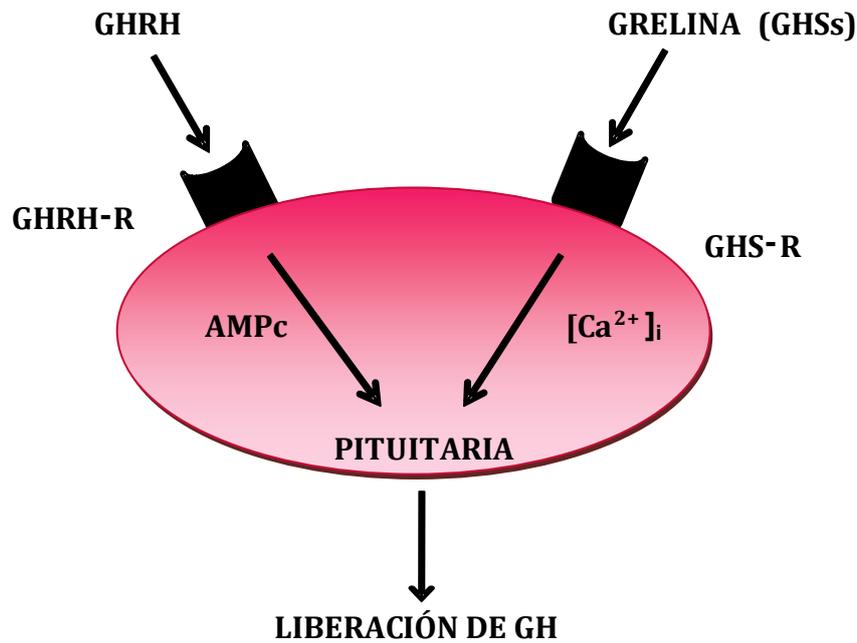


Figura 1. Representación esquemática de los mecanismos comparativos por los cuales Gr y GHRH inducen liberación de GH en los somatotropos de la hipófisis. La activación del receptor de GHRH (GHRH-R) produce incremento de AMPc, mientras que el de Gr incrementa los niveles de calcio intracelulares ([Ca²⁺]_i). Figura modificada de Kojima M y Kangawa K (2005).

ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE GRELINA

En humanos Gr es un péptido de 28 aminoácidos (aa) con un peso molecular de 3.370,9 dalton (Da), (Gr en ratas 3.314,84 Da) en el cual el aa serina ubicado en la posición 3 (Ser3) está esterificado con una cadena octanoilada, lo cual constituye un dominio hidrofóbico (Bednarek M et al. 2000) (Figura 2). Este es el primer caso conocido, hasta el momento, de una hormona peptídica modificada con un ácido graso.

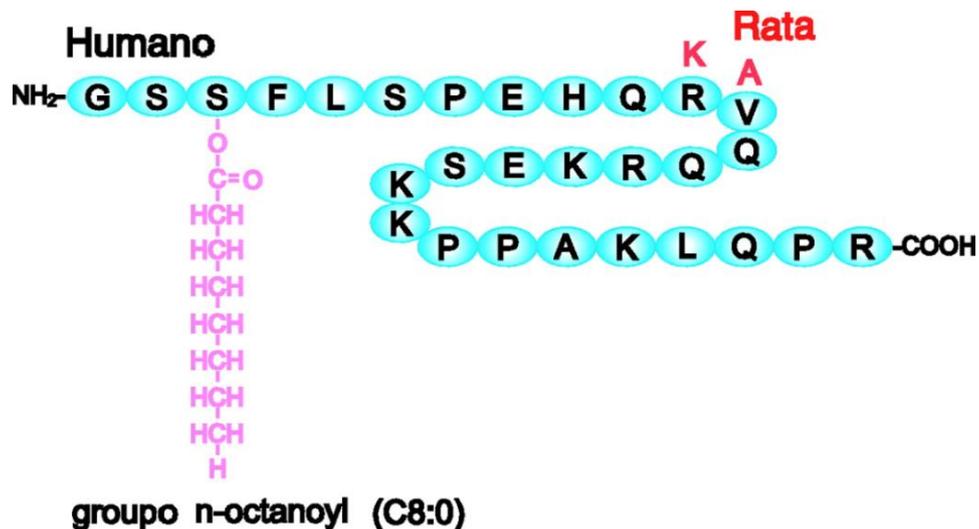


Figura 2. Estructura de Gr humana y de rata en su forma octanoilada. Tanto la Gr humana como la de rata, son péptidos de 28 aa, que difieren sólo en dos residuos de aa, en ambas la Ser3 es modificada por un ácido graso, principalmente n-octanoico. Figura modificada de Kojima M y Kangawa K (2005).

El grupo octanoilo de Gr es esencial para su actividad biológica, además el mismo le confiere liposolubilidad (Hosoda H et al. 2000). Se ha demostrado que de la cadena de 28 aa, el grupo próximo al amino terminal, Gly-Ser-Ser(n-octanoyl)-Phe, constituye una secuencia mínima necesaria para la activación del receptor (Matsumoto M et al. 2001). Esta secuencia es capaz de inducir movilización de Ca²⁺ en las células que expresan su receptor (Bednarek M et al. 2000; Hosoda H et al. 2003).

El gen que codifica para el péptido precursor o pre-proteína que contiene a Gr en humanos, ratas y ratones, se encuentra en el cromosoma 3, 4 y 6 respectivamente. En humanos el gen se localiza en el locus 3p25-26 (Kanamoto N et al. 2004) y comprende 5 exones y 4 intrones (Casanueva F y Dieguez C, 2002). La proteína madura se codifica en los exones 1 y 2 (Figura 3).

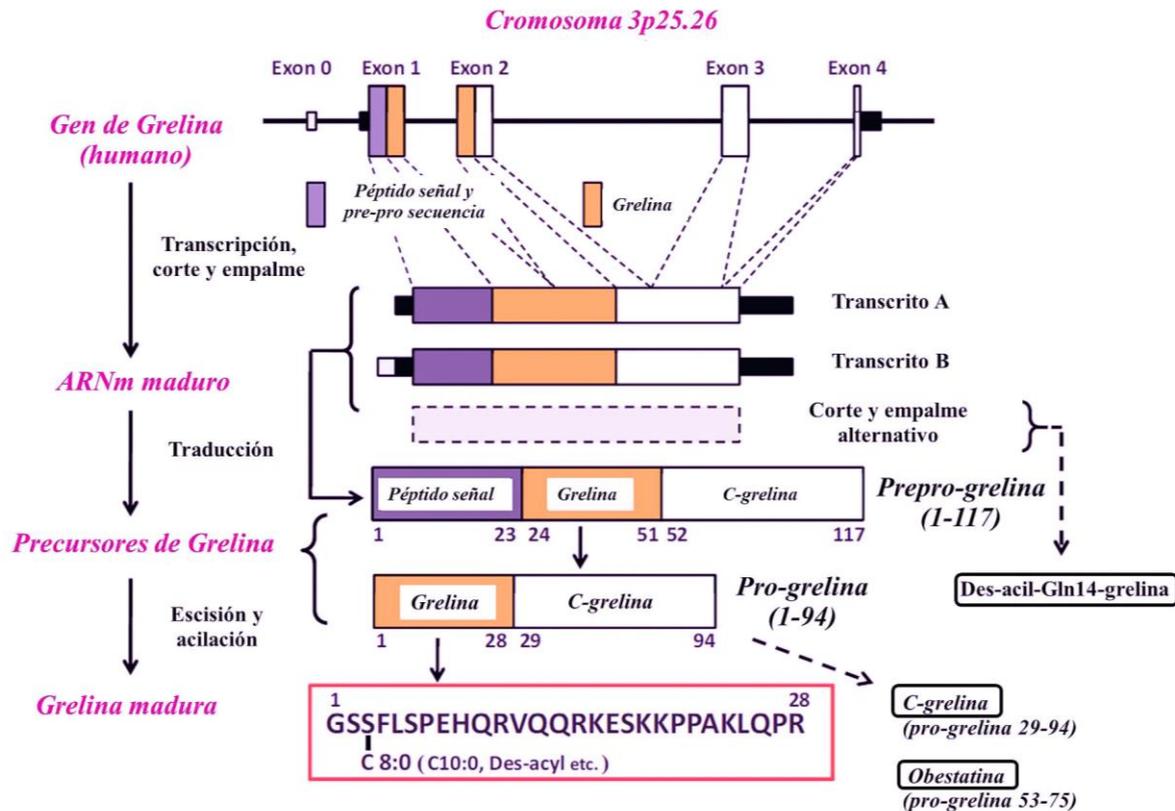


Figura 3. Representación esquemática del gen que codifica para Gr y sus pasos de procesamiento. El gen de Gr humana comprende cinco exones. El primer exón codifica la región 5' no traducida y es muy corto. La transcripción A, un producto alternativo del empalme desde el exón 2 al exón 4, es la forma principal de ARNm de Gr humana. Este ARNm se traduce en un precursor de grelina de 117 aa (prepro-grelina). La escisión de una proteasa y la acil-modificación dan como resultado un péptido activo de 28 aa (Grelina). En rata, ratón y cerdo, otra variante la des-Gln-14 grelina es producida por el corte y empalme alternativo en el extremo del intrón 2. Figura modificada de Kojima M y Kangawa K (2005).

Existen dos sitios diferentes de iniciación de la transcripción en el gen de Gr, resultando en dos transcripciones de ARNm distintas: **transcrito A** y **transcrito B**. La principal transcripción de ARNm en humanos es para un péptido largo de 117 aa: **prepro-grelina (1-117)**. La misma, contiene un **péptido señal** de 23 aa y un segmento de 94 aa llamado **pro-grelina (1-94)**. Esto incluye el péptido de 28 aa maduro de grelina: **Gr (1-28)** y un péptido carboxilo terminal de 66 aa (29-94), denominado **C-grelina**. (Kojima M et al. 2001). Varios hallazgos han sugerido que el péptido C-grelina puede ser procesado a un péptido más pequeño, llamado "**obestatina**", un péptido de 23 aa derivado de pro-grelina

(53-75), cuyos efectos son opuestos a los de Gr (inhibe la ingesta, disminuye el peso corporal, el vaciamiento gástrico y la motilidad intestinal) (Zhang JV et al. 2005).

Además de las respectivas transcripciones de Gr, C-grelina u obestatina, el corte y empalme (splicing) alternativo del gen de Gr genera transcripciones adicionales, codificando otros péptidos, entre ellos **des-Gln14-grelina**, otra molécula biológicamente activa, que es igual a Gr excepto por la ausencia de la glutamina en posición 14, lo que resulta en un péptido de 27 aa (Hosada H et al. 2000). Se ha encontrado que la des-acil-Gln14-grelina tiene la misma potencia que Gr, pero en humanos su producción es mínima (Hosada H et al. 2003).

En todos los mamíferos que se han estudiado, las secuencias de aa de Gr han mostrado un alto grado de similitud. De hecho, los 10 aa N-terminales son idénticos, y la acilación del residuo en posición 3 se encontró, no sólo en mamíferos sino en todas las especies de vertebrados estudiados incluyendo aves, reptiles, anfibios y peces (Kojima M y Kangawa K 2005).

Después de la transcripción y traducción del gen de Gr, los péptidos de Gr se someten a una **modificación postraducciona**l única: acilación del grupo hidroxilo de la Ser3. Esto se realiza más frecuentemente con un grupo n-octanoil (C8:0) y raramente puede estar hecha con otros grupos de ácidos grasos de cadena corta a media (C10:0; C10:1). La enzima que cataliza la unión del ácido n-octanoico a la serina 3 de la Gr es la O-aciltransferasa de Gr (GOAT) y fue descubierta en el año 2008 (Yang J et al. 2008). Se trata de una enzima que pertenece a la familia de las O-aciltransferasas unidas a membrana (MBOATs), concretamente la MBOAT4. La secuencia de GOAT está altamente conservada entre los vertebrados. En ratones, GOAT se localiza en el retículo endoplasmático, y su expresión está bien delimitada dentro del tracto gastrointestinal y los testículos. En humanos se expresa en estómago y páncreas (Figura 4). En ratones, GOAT cataliza de manera específica la unión covalente del ácido n-octanoico a la serina 3 de Gr, mientras que en humanos, puede también acilar a Gr con otros ácidos grasos.

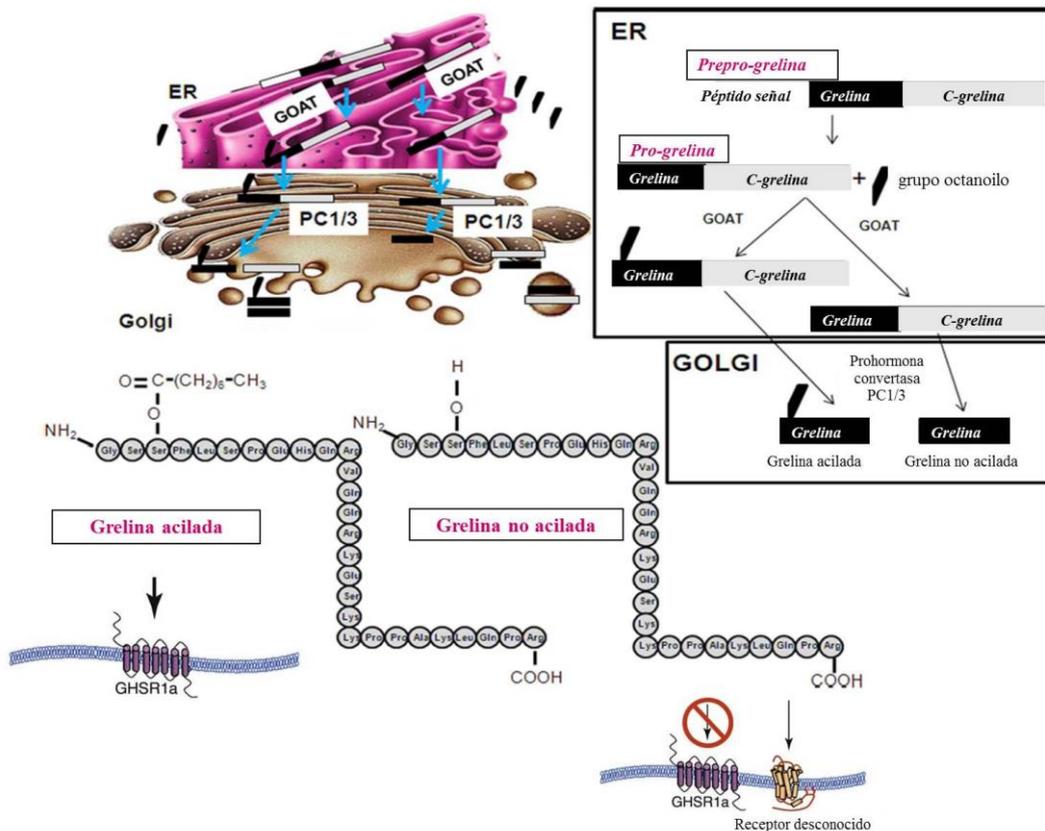


Figura 4. Representación esquemática del proceso postraduccional de Gr. Una peptidasa escinde el péptido señal. La acilación de pro-grelina se produce por medio de GOAT, que está situada en el ER (retículo endoplasmático) y media la translocación del grupo octanoilo. Una vez que el precursor pro-grelina alcanza el compartimiento de Golgi, la prohormona convertasa PC1/3 lo escinde originando diferentes formas de Gr que son liberadas a la circulación: acilada, no acilada, y otras formas más cortas.

Tanto Gr acilada como des-acil Gr están presentes en plasma humano, así como también en estómago, y ambas son activas, con acciones similares y opuestas. La principal forma de Gr que circula en plasma es la forma no acilada (des-acil Gr), la cual representa la forma inactiva del péptido en relación a su unión con el GHS-R1a. (Hosoda H et al. 2000).

El proceso que subyace a la producción de des-acil Gr aún no está claro (Soares JB y Leite-Moreira AF 2008; Kojima M y Kangawa K 2010). En la actualidad, hay dos explicaciones, no excluyentes entre sí, para la producción de des-acil Gr: (1) postula que podría ser una molécula resultante de una acilación incompleta de los péptidos de Gr nacientes, con las dos formas (C8:o y des-acil Gr) siendo secretada a través de dos vías

reguladas de manera diferente, (2) postula que podría ser una molécula resultante de la des-acilación de Gr madura C8:0. La primera explicación se apoya en parte en el estudio de Mizutani M et al. (2009), que demuestra la localización diferencial de la des-acil Gr y C8:0 Gr en estómago de rata, y la demostración de diferentes respuestas secretoras a pH intra-gástrico de ambas. En cuanto a la segunda explicación, se propusieron varias enzimas para ser responsables de este proceso de des-acilación en el suero (De Vriese C et al. 2004; De Vriese C et al. 2007; Satou M et al. 2010), plasma (Ni H et al. 2010) y en el estómago de ratas (De Vriese C et al. 2004; Shanado Y et al. 2004).

Uno de los principales sitios de síntesis de Gr es la mucosa gástrica. Gr inicialmente fue aislada de células secretoras de ácido (células oxínticas) parecidas a las células X/A de la mucosa del fundus gástrico (Arisayu H et al. 2001; Sakata I et al. 2002). La concentración de Gr plasmática en ratas decrece un 80% cuando es removida la porción productora de ácido clorhídrico del estómago, sugiriendo que ésta región es la que más contribuye a los niveles plasmáticos de Gr (Dornonville de la Cour C et al. 2001). Similares resultados se han observado en pacientes sometidos a gastrectomía (Cummings D et al. 2002). Sin embargo ha sido reportado que los niveles plasmáticos de Gr se incrementan gradualmente con el tiempo después de la gastrectomía, sugiriendo que otros tejidos podrían compensar la disminución de la producción de Gr (Hosoda H et al. 2003).

Por otra parte, ha sido demostrado que se produce también a lo largo de todo el tubo digestivo (a excepción del plexo mientérico) (Sakata I et al. 2002) y en otras estructuras periféricas (Mori K et al. 2000; Cowley M et al. 2003). La presencia del péptido se ha detectado en glándula pituitaria (Korbonits M et al. 2001a; 2001b), placenta (Gualillo O et al. 2001), pulmón (Volante M et al. 2002), sistema inmune (Hattori N et al. 2001; Dixit V et al. 2004), ovario con expresión cíclica (Caminos J et al. 2003; Gaytan F et al. 2003), testículos (Tanaka M et al. 2001; Barreiro M et al. 2002; Gaytan F et al. 2004), riñón (Mori K et al. 2000), en páncreas (Date Y et al. 2000; 2002; Gualillo O et al. 2001) y otros tejidos (Caminos J et al. 2005) (Figura 5).

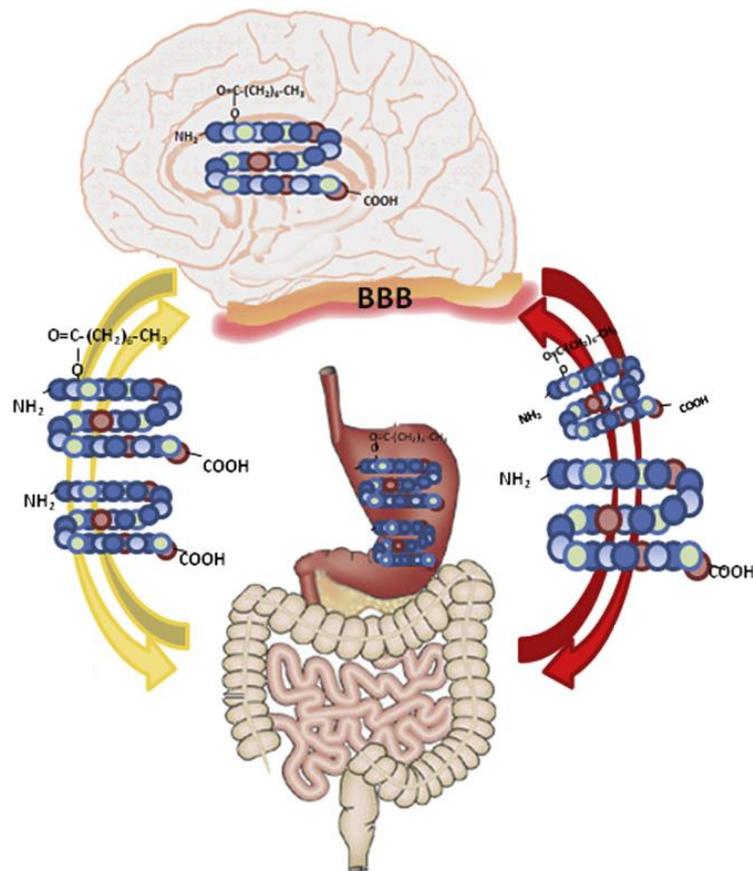


Figura 5. Producción y circulación de Gr. El estómago es el principal sitio de producción de Gr. Des-acil Gr es la principal forma circulante de Gr endógena. Tanto Gr acilada como des-acil Gr pueden actuar en el SNC. Figura adaptada de Schellekens H et al. (2010).

El gen para Gr es expresado en el SNC de rata (Kojima et al. 1999), ratón (Wortley KE et al. 2004) y humano (Gahete M et al. 2010), por lo cual se esperaría encontrar el péptido a ese nivel. En este sentido, estudios inmunohistoquímicos realizados por el grupo de Cowley mostraron la expresión de Gr en el espacio comprendido entre el hipotálamo lateral, el núcleo arcuato (ARC), el núcleo hipotalámico ventromediano, el núcleo dorsal del rafe (NDR) y el paraventricular (Lu S et al. 2001; Cowley M et al. 2003). Fue localizada en terminales axónicas de neuronas del tercer ventrículo que envían proyecciones a neuronas que expresan Neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada con el gen Aguti (AgRP), proopiomelanocortina (POMC) y hormona liberadora de corticotrofina (CRH) (Cowley M et al. 2003). Estudios posteriores utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra Gr acilada (reconocen el grupo octanoilo y no des-acil Gr), RP-HPLC (cromatografía líquida

de alta performance-fase reversa) combinado con RIA (radioinmunoensayo), indicaron la presencia de neuronas inmunoreactivas para Gr en la porción ventral del núcleo arcuato, como así también de RNAm para Gr (Mondal M et al. 2005). Sin embargo, estudios posteriores no pudieron detectar inmunoreactividad específica en cerebro de rata o ratón con los anticuerpos utilizados (Furness JB et al. 2011). En consecuencia la presencia de Gr en el SNC no está aun totalmente esclarecida.

La secreción espontánea de Gr es pulsátil y responde a un ritmo circadiano, con un número de picos e intervalos, mostrando incrementos pre-prandiales, por lo cual se la postula como el disparador de la ingesta de alimento (Ariyasu H et al. 2001; Cummings D et al. 2001; Shiiya T et al. 2002; Tolle V et al. 2002; Koutkia P et al. 2004; Le Roux CW et al. 2005). En ratas, el patrón de secreción episódico se caracteriza por la emisión de 5 a 6 pulsos cada 3 horas (Bagnasco M et al. 2002).

Dependiendo de la especie, la vida media de Gr en plasma oscila entre 9-13 min en humanos, para la forma acilada, y entre 27-31 min para Gr total (Akamizu T et al. 2004; Tong J et al. 2013); en ratas, Gr administrada exógenamente tiene una vida media de 30 min (Tolle V et al. 2002; De Vriese C et al. 2004). Las diferencias en la vida media de Gr podrían explicarse por el hecho de que las enzimas responsables de la des-acilación y la escisión de Gr varían notablemente entre las especies. Por ejemplo en algunos tejidos, como estómago se encuentran diferentes enzimas entre ellas lisofosfolipasa I y endoproteasas como dipeptidil peptidasa (DDP) II; en hígado y riñones DDPs I, II, III y IV, aminopeptidasa N, entre otras (De Vriese C et al. 2004). Butirilcolinesterasa es la enzima predominante responsable de la inactivación de Gr en suero humano, mientras que carboxilesterasas permiten una des-acilación ocho veces más rápida de Gr en roedores. (De Vriese C et al. 2004; 2007).

Los niveles plasmáticos de Gr varían de acuerdo al estado crónico nutricional (Tanaka M et al. 2002). Ha sido reportado que Gr aumenta por carencia de alimentos y disminuye después de la ingesta, alcanzando los valores mínimos 60-120 min post-

prandial (Hewson A et al. 2000; Tschop M et al. 2000; 2001; Ariyasu H et al. 2001; Toshinai K et al. 2001; Cummings D et al. 2001; 2002; Callahan H et al. 2004).

Por otra parte los niveles plasmáticos de Gr disminuyen en patologías tales como obesidad y se restituyen al bajar de peso (Tschop M et al. 2001; Ariyasu H et al. 2002; Bellone S et al. 2002; Cummings D et al. 2002; Van Der Lely A et al. 2004). Por el contrario, los niveles plasmáticos de Gr se incrementan en condiciones tales como anorexia y bulimia, donde se presenta un balance energético negativo (Rigamonti A et al. 2002). Estos niveles pueden disminuir con la ganancia de peso corporal (Ariyasu H et al. 2001). En roedores, la expresión de Gr se encuentra incrementada cuando están hambrientos, pero sus niveles plasmáticos disminuyen después de la ingesta o la infusión de nutrientes dentro del estómago (Asakawa A et al. 2001; Bagnasco M et al. 2002). En consecuencia se ha sugerido que agonistas y antagonistas de los receptores del péptido, puedan ser usados como agentes terapéuticos para el tratamiento de patologías relacionadas con la alimentación.

Diversos estímulos metabólicos, hormonales y neurales modifican la secreción de Gr, tales como insulina, glucosa y la estimulación vagal. Así por ejemplo, ha sido demostrado que la infusión de insulina produce una disminución en los niveles de Gr, tanto en humanos como en animales (Toshinai K et al. 2001; McCowen K et al. 2002; Saad M et al. 2002; Shiiya T et al. 2002), y que la estimulación del nervio vago estimula la secreción de Gr (Mundinger T et al. 2006).

RECEPTOR DE GRELINA: ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN

El receptor de Gr, o GHS-R, es un típico receptor acoplado a proteína G (GPCR) codificado por un gen localizado en el cromosoma 3q26.31 en humanos, altamente conservado a través de las especies (McKee K et al. 1997a; 1997b) lo cual sugiere un importante rol fisiológico para Gr. Este gen consiste en dos exones separados por un intrón, el primer exón codifica los dominios transmembrana (TM) 1-5 (TM 1 – TM 5) y el segundo

exón codifica las unidades TM 6 y TM 7. El procesamiento alternativo del ARNm genera dos tipos de receptores, designados como GHS-R tipo 1a (GHS-R1a) y tipo 1b (GHS-R1b) (Howard A et al. 1996; Smith R et al. 2001; Camiña JP 2006) (Figura 6).

En humanos el tipo GHS-R1a es el subtipo funcional, conformado por un polipéptido de 366 aa con siete dominios TM (TM 1-7) que le confieren alta afinidad por Gr y por sus análogos sintéticos (GHS) (Howard A et al. 1996). El tipo GHS-R1b es codificado sólo por el primer exón, por lo tanto está conformado por 5 dominios TM, siendo una forma truncada en el COOH-terminal del tipo 1a farmacológicamente inactiva. (Howard A et al. 1996; McKee K et al. 1997a; Camiña JP 2006).

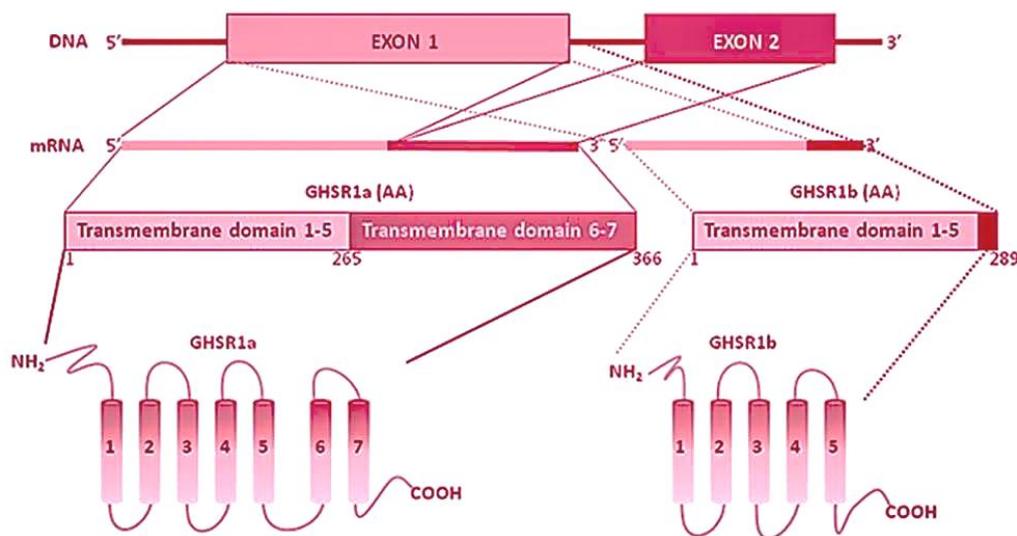


Figura 6. Estructura del receptor de Gr. El GHS-R1a se encuentra en el cromosoma 3p26.2 y es procesado a partir de ARNm codificado por el exón 1 y 2 después del procesamiento de la secuencia intrónica. El splicing alternativo produce ARNm de GHS-R1b codificado por el exón 1 y el intrón con un sitio de poliadenilación alternativo que codifica un polipéptido truncado con sólo 5 dominios transmembrana. Figura extraída de Schellekens H et al. (2010).

El GHSR1b hasta ahora sólo ha sido encontrado en humanos, cerdos, rana, pollo y pescado. Ratas y ratones no expresan esta variante. Gr y otros GHS no se unen a GHS-R1b, por lo que no tiene actividad funcional medible. Sin embargo, estudios previos han demostrado que GHS-R1b puede atenuar la señalización de GHS-R1a, lo que indica que GHS-R1b tiene importancia biológica, posiblemente mediante la formación de heterodímeros con GHS-R1a (Chan y Cheng 2004).

La presencia del ARNm para *GHS-R1a* ha sido demostrada en distintas áreas del SNC, tales como células somatotropas de glándula pituitaria (Ong H et al. 1998), ARC del hipotálamo (Howard A et al. 1996), en estructuras extra-hipotalámicas, fundamentalmente en hipocampo, en las regiones CA₁, CA₂, CA₃ y giro dentado; y también en sustancia nigra, área tegmental ventral, NDR (Zigman JM et al. 2006). Además, también se ha detectado ARNm para *GHS-R1a* en diferentes tejidos periféricos tales como corazón, arterias, riñón, músculo esquelético, pulmón, estómago, intestinos, hígado, tejido adiposo, corteza adrenal, células inmunes, células tumorales, indicando que Gr tiene varias funciones fisiológicas (Broglia F et al. 2003).

La unión de Gr al *GHS-R1a* induce la activación de fosfolipasa C, incrementando los niveles de inositol trifosfato (IP₃) y proteína quinasa dependiente de Ca²⁺ (PKC), promoviendo aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) (Smith R et al. 2001) (Figura 7).

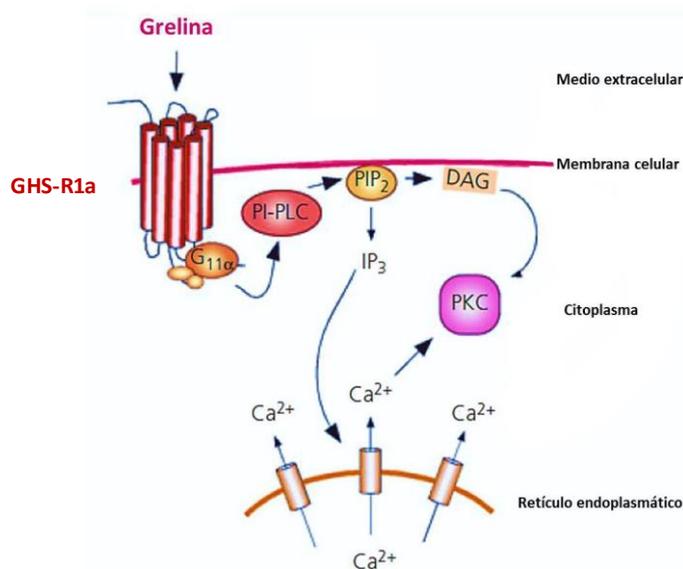


Figura 7. Activación del receptor de Gr. Gr se une a su receptor específico *GHS-R1a* e induce la activación de fosfolipasa C (PLC), incrementando los niveles de IP₃ y DAG, aumentando de esta manera las [Ca²⁺]_i.

Se ha demostrado que pueden activarse además, proteínas quinasas que incluyen: I) proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y ERK1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares) (Baldanzi G et al. 2002; Nanzer A et al. 2004; Delhanty PJ et al. 2006; Granata R et al. 2007); II) tirosina-quinasa dependientes MAPK, (Cassoni P et al.

2001; Mazzocchi G et al. 2004; Camiña JP 2006); III) IP₃ quinasa/Akt y MAPK (Murata M et al. 2002; Camiña JP 2006).

Gr estimula la internalización del receptor GHS-R1a desde la superficie celular al compartimiento intracelular (Camiña JP et al. 2004). El GHS-R1a se internaliza de manera tiempo-dependiente con un máximo de internalización a los 20 minutos tras la estimulación con Gr. El complejo ligando-receptor se internaliza en vesículas ricas en clatrina (endosomas) y posteriormente es reciclado a la membrana. Así, el nivel de receptores en la superficie celular alcanza de nuevo el 100% a los 360 minutos tras la estimulación con Gr. Además, la activación de GHS-R1a conduce al reclutamiento de adaptadores de clatrina tipo AP2, o β -arrestinas, de una manera que es independiente del acoplamiento a proteína G (Damian M et al. 2012; Mokrosiński J et al. 2012) (Figura 8).

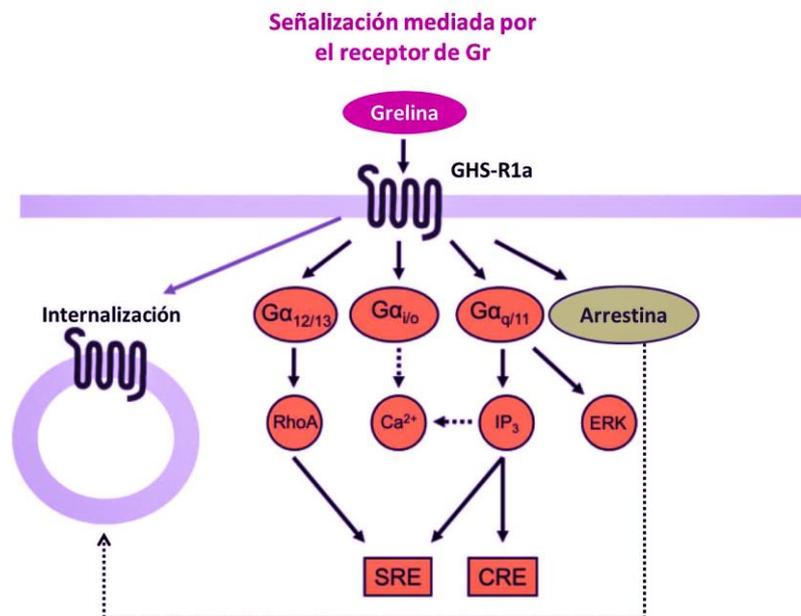


Figura 8. Múltiples vías de señalización del receptor de Gr. El receptor de Gr puede actuar a través de 3 diferentes proteínas G conteniendo diferentes subunidades $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$, y $G\alpha_{i/o}$. $G\alpha_{q/11}$ activa PLC llevando a un incremento de IP₃ y formación de DAG y aumento de Ca²⁺ intracelular. El acoplamiento $G\alpha_q$ puede llevar también a modificar la actividad transcripcional mediada por CRE y la fosforilación de ERK. $G\alpha_{12/13}$ por su parte activa la cascada de las quinasas RhoA resultando en la transcripción de SRE (genes regulados por el suero). Además, una estimulación del receptor con su agonista endógeno conduce a la movilización de β -arrestina, que podría contribuir a la internalización del receptor. (Flechas de puntos representan vías de señalización no comprobadas totalmente y flechas completas indican vías que han sido descritas o sugeridas para el receptor de Gr). Adaptado de Sivertsen B et al. (2013).

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE GRELINA

Ya en el año 2000, se descubrió que Gr actúa en el SNC regulando la ingesta, el peso corporal, la adiposidad y el metabolismo de la glucosa (Tschop M et al. 2000). Se demostró que modula el metabolismo activando circuitos neurales orexigénicos fundamentalmente en hipotálamo (Cowley MA et al. 2003; Nakazato M et al. 2001). Posteriormente, fueron descritas numerosas acciones centrales y periféricas de Gr incluyendo entre otras, estimulación de la motilidad y secreción gástrica (Masuda Y et al. 2000; Asakawa A et al. 2001), modulación del sueño (Tolle V et al. 2002; Szentirmai E et al. 2006), de la sensación de gusto, de la conducta de búsqueda y recompensa (Cai H et al. 2013; Tong J et al. 2011), regulación del metabolismo de la glucosa (Date Y et al. 2002; Zhao TJ et al. 2010), supresión de la termogénesis de la grasa marrón (Yasuda T et al. 2003; Lin L et al. 2011), modulación del estrés y la ansiedad (Lutter M et al. 2008; Chuang JC et al. 2011), mejoramiento de las funciones cardiovasculares como contractibilidad cardíaca y vasodilatación (Rizzo M et al. 2013; Nagaya N et al. 2004). (Revisión más detallada en Muller TD et al. 2015).

En lo que a efectos de Gr sobre el SNC se refiere, se han descrito una gran variedad que involucran diferentes estructuras. La comprensión del rol fisiológico de esta hormona a nivel central requiere que la misma, que es producida a nivel del estómago, pueda unirse a sus receptores específicos en las diferentes estructuras nerviosas.

Las hormonas peptídicas, no pueden entrar libremente al cerebro. La BHE impone restricciones al paso de determinadas moléculas. Así, en el caso particular de Gr la accesibilidad estaría limitada y restringida a determinadas áreas específicas. Gr periférica pareciera alcanzar y activar áreas localizadas próximas a los órganos circunventriculares. Las fenestraciones de los capilares de estas estructuras permiten la penetración de pequeñas moléculas al espacio intercelular y de allí a las estructuras vecinas. Se ha demostrado que el ingreso de Gr ocurre en el ARC, eminencia media (ME) y en menor cantidad en el área postrema (PA) (Cabral A et al. 2015). No está aun claramente

determinado, cómo Gr alcanza otras estructuras. Se ha postulado que Gr podría alcanzar el cerebro a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) después de atravesar los plexos coroideos, cuyas células rodean a los capilares en los ventrículos cerebrales y producen el LCR, o bien a través de los tanicitos hipotalámicos. Otra opción posible, sería que Gr al igual que otras hormonas actúe en órganos circunventriculares, como el órgano subfornical o el área postrema, los cuales detectan niveles plasmáticos de hormonas y transfieren dicha información a regiones específicas del cerebro (Cabral A et al. 2015).

La figura 9 resume los principales efectos biológicos descritos para la hormona Gr:

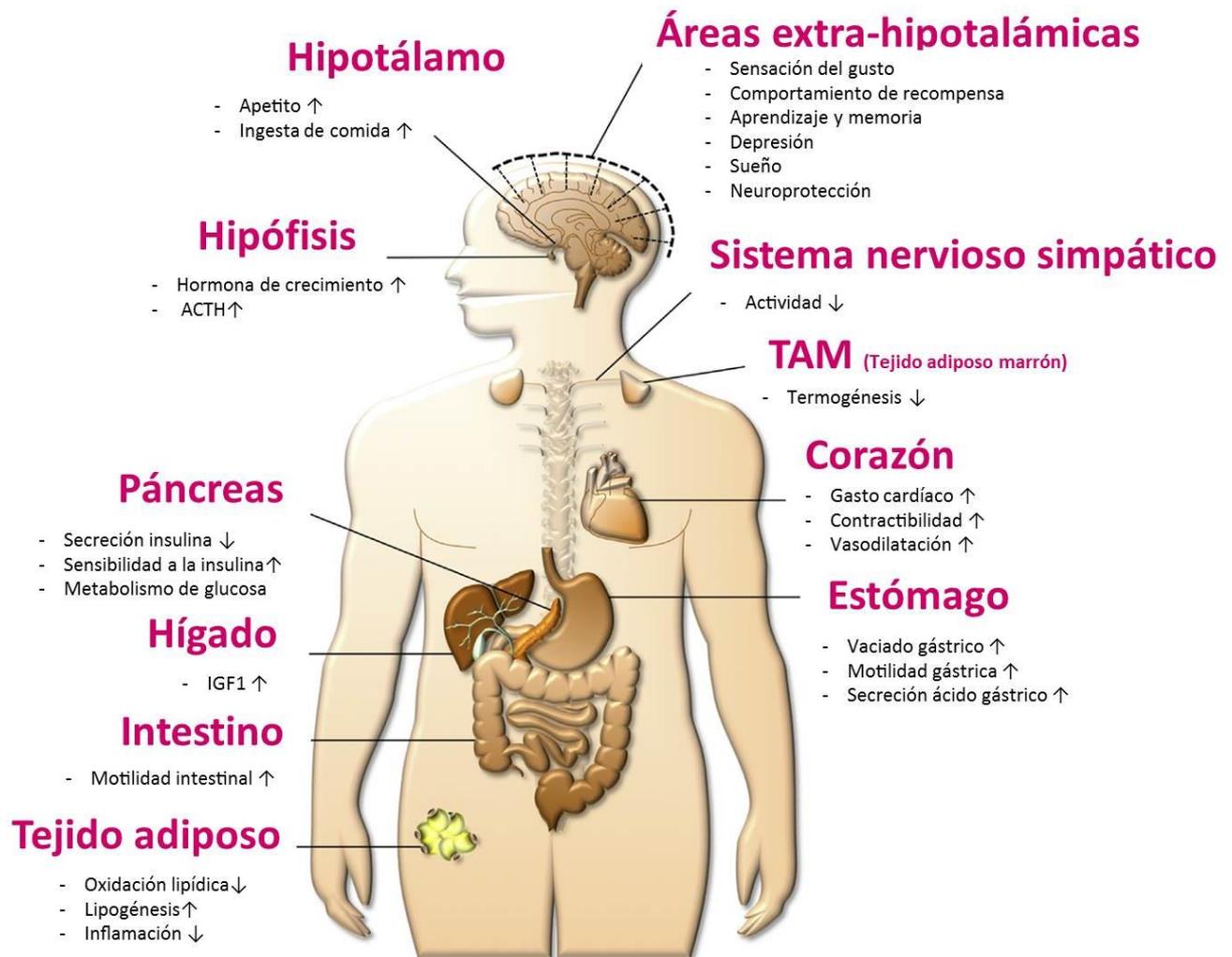


Figura 9. Esquema de los principales efectos biológicos de Gr. Figura modificada de Muller TD et al. (2015).

APRENDIZAJE Y MEMORIA

Muchos aspectos del comportamiento de los seres humanos y de los animales son resultado del aprendizaje. Aprendemos a leer, a escribir, a bajar las escaleras sin caer, a andar en bicicleta y a nadar. También aprendemos cuándo relajarnos y cuándo preocuparnos, qué alimentos probablemente disfrutemos y cuáles no, como así también gestos implicados con las interacciones sociales. La vida está llena de actividades y experiencias moldeadas por lo aprendido.

El aprendizaje es uno de los procesos biológicos que facilitan la adaptación al ambiente. La calidad de vida y la sobrevivencia misma dependen de una coordinación intrincada de la conducta con las complejidades del ambiente. Los animales, incluyendo a las personas, tienen por ejemplo que aprender a encontrar nuevas fuentes de comida cuando las anteriores se vuelven inaccesibles o cuando cambian de hábitat. Para ello se requiere de conductas motoras, como caminar y manipular objetos; también requieren de la capacidad para predecir los sucesos importantes del entorno, como el lugar y el momento en que la comida estará disponible. Dicho de otra manera el aprendizaje implica relaciones entre eventos en el entorno, el aprendizaje de reacciones emocionales ante los estímulos y el aprendizaje de movimientos motores. En consecuencia, implica la adquisición de nuevas conductas (poder leer, andar en bicicleta o tocar un instrumento musical) y también puede implicar la disminución o pérdida de una respuesta que antes era común, por ejemplo un niño puede aprender a no cruzar la calle cuando el semáforo está en rojo. Aprender a no realizar ciertas respuestas es tan importante como aprender a realizarlas.

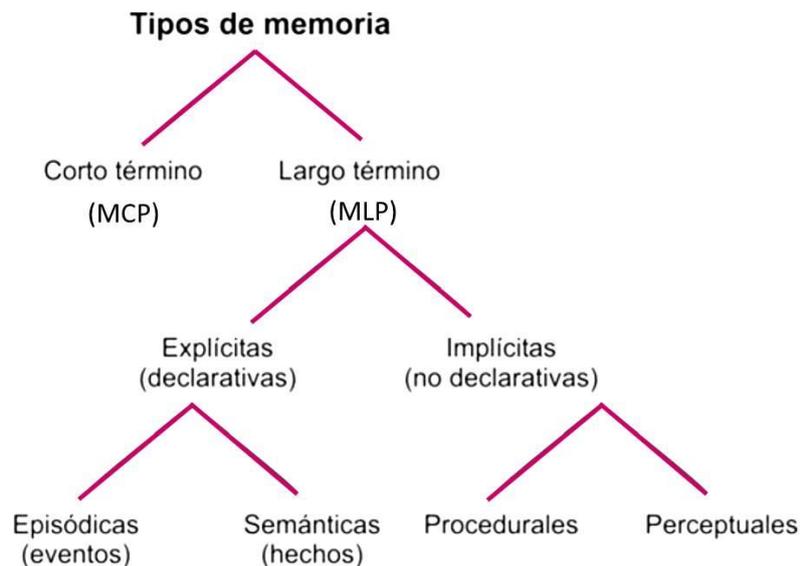
La conducta adopta muchas formas, que van desde los reflejos simples hasta las reacciones emocionales complejas. Aunque la conducta ocurre como reacción a un estímulo, no es invariable ni rígida y una de sus características distintivas es que es modificada por la experiencia (Domjan M 2010).

La representación interna de esta información, se encuentra codificada en circuitos neuronales en forma de patrones espacio-temporales de actividad, adquiridos mediante

cambios en las propiedades reactivas de las neuronas como producto del aprendizaje (Dudai Y 2002).

De acuerdo a Domjan M (2010) definimos al **aprendizaje** como “un cambio duradero de la conducta que involucra estímulos y/o respuestas específicos y que es resultado de la experiencia previa con esos estímulos y respuestas o con otros similares”, y a la **memoria** como la capacidad de retener esa información en el tiempo, manteniéndola disponible para ser eventualmente recuperada o evocada en el futuro.

Se han desarrollado varios esquemas taxonómicos para los diferentes tipos de memoria, la mayoría comparten una forma genérica común (ver Esquema I).



Esquema I. Taxonomía de los tipos de memoria. La memoria puede ser clasificada en memoria de corto término o plazo (**MCP**) y memoria de largo plazo (**MLP**). La **MLP** se puede dividir en memorias **explícitas** (declarativas) e **implícitas** (no declarativas). La memoria implícita afecta a la conducta sin participación de la conciencia. La memoria explícita se subdivide en memoria **semántica**, representando el conocimiento general sobre el mundo, y la memoria **episódica**, representando el conocimiento personal sobre el pasado propio. Aunque esta forma genérica de división se aplica directamente a los sistemas de memoria en humanos, una clasificación similar sería aplicable a la memoria en animales, aunque pueda carecer de algunas características típicas de las memorias en humanos.

Primero se hace la distinción entre **MCP** y **MLP**. De este modo, al referirse a una **MCP** se entiende que es una memoria que no dura más que unas pocas horas y es

independiente de la síntesis proteica. En cambio, una MLP, generalmente hace alusión a una memoria que perdura al menos 24 horas, y depende para su establecimiento de la síntesis proteica, entre otros eventos moleculares (Izquierdo I et al. 1999; McGaugh 2000; Hernandez PJ y Abel T 2008). Esta última se divide en **explícitas** (o declarativas) e **implícitas** (o no declarativas).

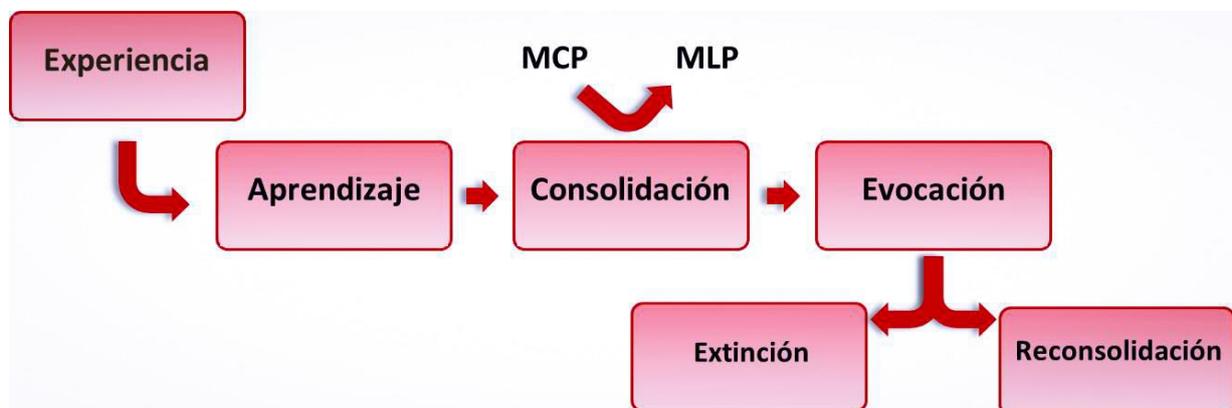
Memoria Implícita (no declarativa): este tipo de memoria se recuerda de manera inconsciente y es la encargada de guardar la información sobre cómo desarrollar alguna actividad, se refiere a las capacidades reflejas-motoras y perceptivas. Este tipo de memoria se clasifica además como **asociativa** y **no asociativa**. La **asociativa** puede dividirse a su vez en dos tipos de condicionamientos: **clásico**, implica aprender la relación entre dos estímulos y el **operante**, el cual implica aprender la relación entre la conducta de un individuo y la consecuencia de dicha conducta. Por otra parte, dentro de la **no asociativa** podemos distinguir entre dos tipos de aprendizaje: **sensibilización**, que es un incremento en la fuerza de la conducta provocada que puede ser resultado de la presentación repetida del estímulo provocador o de la exposición a un estímulo externo intenso, y la **habitación**, que es la disminución progresiva de la fuerza de la conducta provocada que puede ocurrir con la presentación repetida del estímulo. Cabe aclarar, que la habituación se distingue de la adaptación sensorial (disminución temporal en la sensibilidad de los órganos sensoriales provocada por la estimulación repetida o excesiva) y la fatiga (disminución temporal de la conducta ocasionada por el uso repetido o excesivo de los músculos involucrados en la conducta), ya que las mismas son impedimentos para la respuesta que se producen en los órganos sensoriales y los músculos, fuera del sistema nervioso, y no se consideran aprendizajes (Domjan M 2010).

Memoria explícita (declarativa): Este tipo de memoria requiere de un esfuerzo consciente por recordar, guarda el conocimiento objetivo sobre lugares, personas y cosas, y lo que ello significa. Esta memoria además puede clasificarse como **episódica** (eventos específicos del pasado) o **semántica** (conocimientos generales) (Tulving E 1987).

Respecto a la cognición semántica, existen evidencias de que los animales dividen el mundo categóricamente en objetos y que, aunque no poseen expresiones verbales, pueden demostrar a través de su comportamiento que “saben” qué son esos y otros tipos de objetos (Clayton NS et al. 2003). Además, algunos estudios recientes modelan la memoria episódica en animales como una memoria de cuándo, dónde y qué evento ha ocurrido (Clayton NS y Dickinson A 1998), o como la memoria de la propia conducta del animal (Hampton RR 2001).

Es importante tener en cuenta que el aprendizaje puede contener elementos tanto de memoria explícita como implícita y que los procesos de memoria de muchos tipos de aprendizajes afectan a más de un área cerebral.

En general la formación de una memoria no se trata de un proceso único, sino que es el resultado de la integración de **fases o etapas**, en las cuales pueden intervenir procesos y mecanismos diferentes tales como, la **adquisición** de la información, **consolidación** y **evocación** (ver Esquema II). Dicho de otro modo, para tener memoria de algún suceso, primero hay que adquirir la información pertinente, luego la memoria deberá atravesar una etapa de consolidación en la que será “guardada” en un sistema de almacenamiento de largo plazo y finalmente, para poder recordar, tiene que existir un mecanismo que permita poner en juego la memoria: la evocación.



Esquema II. Etapas de procesamiento y almacenamiento de la información: aprendizaje, consolidación, evocación, reconsolidación y extinción.

El **aprendizaje** es uno de los procesos por los cuales las experiencias producen cambios persistentes en el sistema nervioso que se expresan en el comportamiento del individuo. Una **MCP** se transforma en una **MLP** mediante el proceso de consolidación. La MCP permite mantener la información durante algunos minutos u horas y a nivel molecular es sostenida por modificaciones covalentes de proteínas sinápticas existentes que alteran la eficacia de la transmisión sináptica. En la MLP la información es almacenada durante días, semanas o incluso toda la vida y requiere de la transcripción de genes y la síntesis de nuevas proteínas (Izquierdo I et al. 1999; McGaugh 2000; Hernandez PJ y Abel T 2008). La **consolidación de la memoria** se refiere al proceso de estabilización dependiente del tiempo y de nueva síntesis de proteínas, que resulta en el almacenamiento de una memoria nueva. La **evocación** se refiere a los procesos que permiten la recuperación y la utilización de la información almacenada, es decir, el recuerdo consciente o inconsciente de la experiencia, y que puede manifestarse o no, a través de un cambio en el comportamiento (Dudai Y y Eisenberg M 2004; Kandel ER 2001; McGaugh JL 2000). La evocación de la memoria puede inducir el proceso de **reconsolidación** con el fin de reestabilizar después del recuerdo la memoria previamente formada. Este proceso no es una recapitulación de los mecanismos que subyacen a la consolidación inicial sino que constituye un proceso activo dependiente de síntesis de proteínas (Dudai Y y Eisenberg M 2004; Nader K et al. 2000). Como consecuencia de la evocación también se puede inducir otro proceso denominado **extinción** de la memoria. La extinción es un nuevo proceso de aprendizaje activo y constituye una modificación de la representación interna de la experiencia que conduce a la supresión temporaria de la expresión inducida por la memoria original (Milad MR y Quirk GJ 2012). (Ver Esquema II)

Todos estos procesos (consolidación, reconsolidación y extinción de la memoria), pueden ser modulados por diversos neurotransmisores, hormonas y señales periféricas (McGaugh JL 2004; Boccia MM et al. 2009; Boccia MM et al. 2010); y pueden estudiarse a distintos niveles: **comportamental** utilizando paradigmas conductuales adecuados,

neural analizando los circuitos neuronales implicados y **molecular** analizando las moléculas y reacciones que participan en un dado evento.

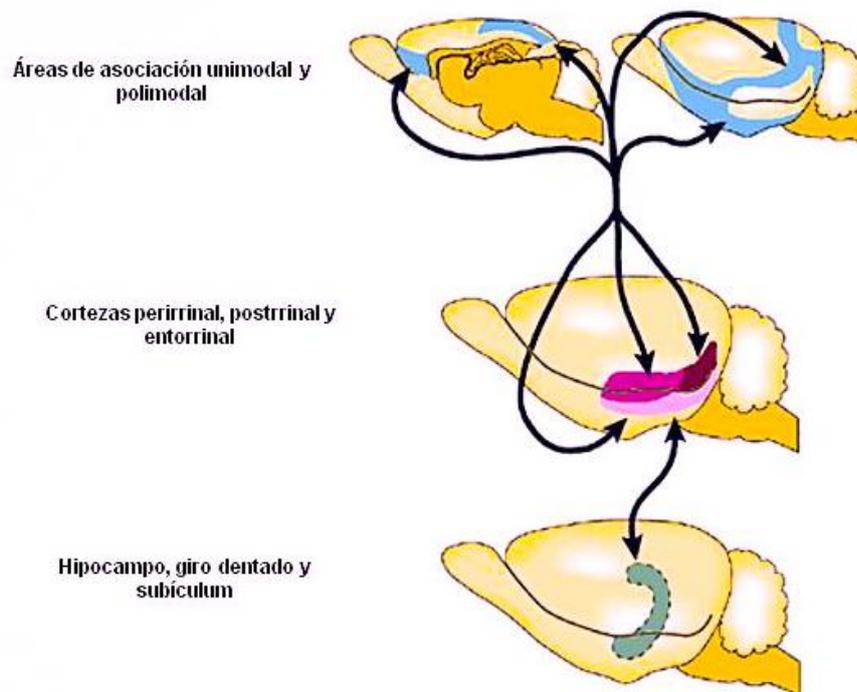
El comportamiento de un individuo es susceptible de ser afectado por la memoria. Por ejemplo, un animal que aprendió que un lugar determinado es peligroso, si lo recuerda, lo evitará en el futuro. Este cambio comportamental de evidente valor adaptativo, es una de las herramientas fundamentales para el estudio de la memoria. De esta manera, existe una gran variedad de modelos animales para estudiar la memoria y sus mecanismos biológicos, desde insectos y crustáceos hasta roedores y primates. En todos ellos, típicamente, se somete a los individuos a una sesión de entrenamiento en la que estos aprenden una tarea que produce un cambio en el comportamiento. Pasado cierto tiempo, se evalúa comportamentalmente si los animales retienen la memoria adquirida durante el entrenamiento.

Los **mecanismos celulares y moleculares involucrados** en el proceso de **consolidación de la memoria** han sido profundamente estudiados en el último siglo en diferentes especies y utilizando los más variados paradigmas comportamentales y, dentro de su diversidad, estos mecanismos han mostrado ser un fenómeno universal (McGaugh JL 2000; Dudai Y 2004; Abel T y Kandel E 1998), independientemente del grado de complejidad del sistema nervioso en las distintas especies. Ha sido descrita una serie de eventos moleculares que ocurren en las sinapsis al momento de la formación y consolidación de la memoria. Algunos de estos eventos involucran activación de distintos receptores de membrana, señalizaciones mediadas por calcio, AMPc, cascadas de quinasas y activación de factores de transcripción, culminando con la expresión de distintos genes (Bernabeu R et al. 1997; Abel T et al. 1997; McGaugh JL 2000; Locatelli F et al. 2002).

El término consolidación es usado corrientemente para referirse al fenómeno por el cual una memoria lábil es estabilizada, pero también este término, es utilizado para indicar, en algunas memorias particulares, una transferencia de la memoria, desde circuitos en donde reside inicialmente, hacia circuitos localizados en regiones distintas del cerebro, en particular desde el hipocampo hacia la corteza (Debiec J et al. 2002). Este

proceso representa una estabilización ulterior y para diferenciarlo del proceso anterior, es llamado **consolidación de sistemas** (Debiec J et al. 2002; Dudai Y 2004), mientras que el primero es diferenciado llamándolo **consolidación sináptica** (Dudai Y 2004) o **consolidación celular** (Debiec J et al. 2002).

En términos biológicos, un sistema de memoria es definido como una estructura neural y sus interconexiones, que en conjunto procesan un tipo particular de información y participan en el guardado de tal información, tanto dentro como fuera de la propia estructura (Kim J y Baxter M 2001). Un sistema de memoria anatómicamente definido es el lóbulo temporal medial (LTM) que incluye la formación hipocampal, el hipocampo propiamente, el giro dentado, el subículum, la corteza entorrinal y cortezas adyacentes – perirrinal y postrrinal– (ver Esquema III). (Squire L y Zola S 1996; Burwell R y Amaral D 1998).



Esquema III. Sistema de memoria del LTM y sus conexiones. En la rata la información que llega al hipocampo proviene de áreas de asociación de la **neocorteza** (azul). Ésta proyecta a las **cortezas perirrinal** (fucsia), **postrrinal** (bordó) y **entorrinal** (rosa), que están a su vez interconectadas. De este modo, la corteza entorrinal es un sitio de convergencia y distribución de la información proveniente de la corteza al **hipocampo, giro dentado y subículum** (verde). Al mismo tiempo, es la principal vía de salida de la información desde el hipocampo, giro dentado y subículum.

El LTM, en particular el **hipocampo**, es un lugar de convergencia multimodal. Contiene neuronas que registran información referida a estímulos ambientales y referida al contexto en el cual ocurren los eventos, por lo tanto, tiene un rol principal en el aprendizaje de relaciones espaciales y en la formación de asociaciones complejas, por ejemplo, aprendizaje espacial y memoria en roedores y la memoria declarativa o episódica en el hombre (O'Keefe J y Nadel L 1978).

El hipocampo contiene neuronas piramidales cuyos cuerpos celulares se ubican en una capa única densamente empaquetada llamada Cuerno de Ammonis (CA), la cual se divide en tres regiones anatómicas principales: CA1, CA2 y CA3. El giro dentado (DG) es una banda estrecha de sustancia gris que sigue el borde interno del hipocampo. Las conexiones intrínsecas entre neuronas de la formación hipocámpal son fundamentalmente glutamatérgicas, aunque existen interneuronas inhibitorias que modulan las vías excitatorias. El **circuito excitatorio del hipocampo** consiste de tres vías principales. Sin embargo, estas vías constituyen una simplificación de las conexiones sinápticas existentes dentro del hipocampo y con otras áreas cerebrales. La información proveniente de estructuras corticales o subcorticales entra al DG a través de la **vía perforante** desde la corteza entorrinal. Desde las células granulares del DG la información es transmitida a las células piramidales del área CA3 a través de la **vía de las fibras musgosas**. Las neuronas del área CA3 envían proyecciones a las células piramidales del área CA1 a través de la **vía de las colaterales de Schaffer**. Finalmente, la información proveniente de las neuronas de CA1 retorna a estructuras corticales y subcorticales (Purves D et al. 2012). (Figura 10).

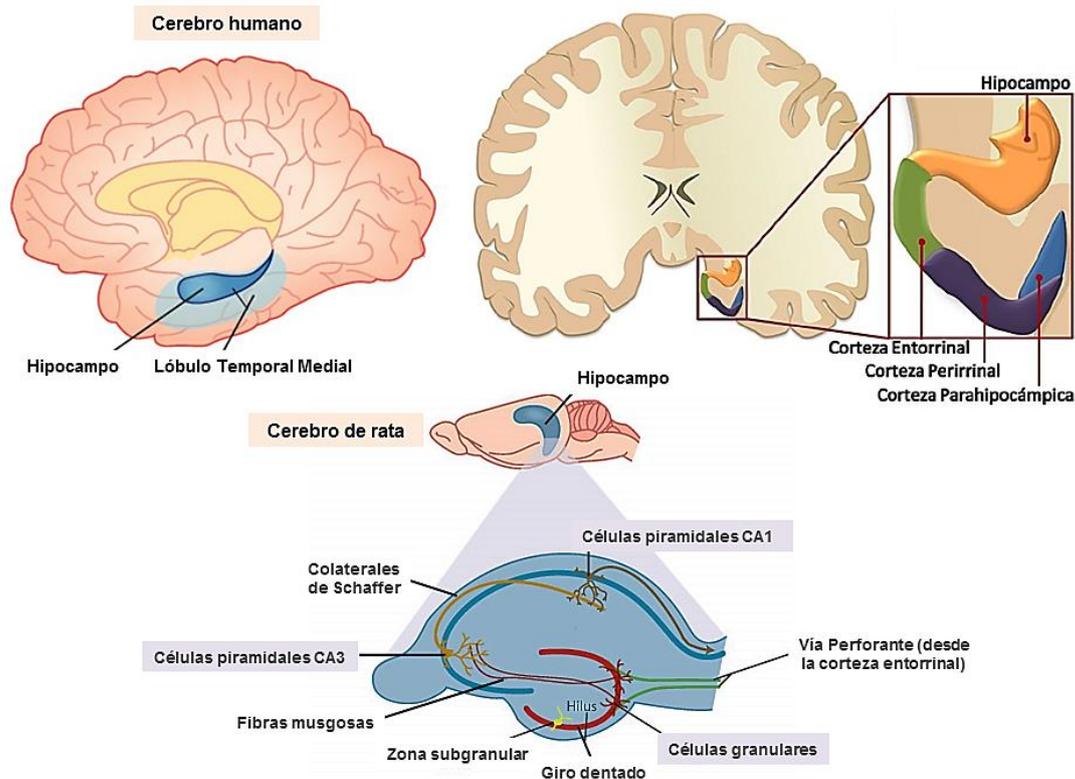


Figura 10. Esquema de localización del hipocampo en cerebro humano y de roedor. Sección sagital hipocampal que muestra los principales circuitos excitatorios. Figura adaptada de Purves D et al. (2012).

En diferentes áreas cerebrales se observa una forma de plasticidad sináptica que es requerida para la formación de la memoria y de ciertos tipos de aprendizajes (Martin S y Morris R 2002). La **plasticidad** es la capacidad del sistema nervioso de adaptarse y mejorar su eficiencia funcional en los circuitos sinápticos en respuesta a estímulos que provienen del medio interno o externo. Los mecanismos que explican los fenómenos de plasticidad y su correlación con la función de una estructura o un proceso en particular son múltiples. Algunos de ellos implican incremento en la liberación de neurotransmisores o mediadores en el espacio sináptico, cambios en la actividad de neuronas que influyen sobre la liberación presináptica de los neurotransmisores, aumento del número de receptores postsinápticos, cambios en las cascadas de mensajeros intracelulares, modificaciones en las espinas dendríticas y traslocación de contactos sinápticos, entre otros (Bi G y Poo M 1998).

En el año 1973 Bliss y Lomo pudieron relacionar, por primera vez, cambios en la plasticidad con procesos de memoria. Trabajando en hipocampo de conejos, en sinapsis entre el tracto perforante y las células granulares del DG, demostraron que una estimulación breve de alta frecuencia en esta vía excitatoria, causaba un incremento sostenido en el tiempo en la eficiencia de la transmisión sináptica (Bliss TV y Lomo T 1973; Bliss TV y Collingridge GL 1993). Este efecto fue denominado **Potenciación a Largo Plazo** (LTP, del inglés Long Term Potentiation) y ha sido estudiado en diferentes especies, desde roedores hasta primates (Nosten-Bertrand M et al. 1996). Este fenómeno puede generarse en todas las sinapsis excitatorias del hipocampo, como así también, en otras estructuras cerebrales como amígdala, cerebelo y corteza, presentando características particulares en cada una de ellas. Posteriormente, muchos estudios han demostrado similitudes en la naturaleza y los tiempos de los cambios moleculares entre la LTP y la formación de la memoria en hipocampo (Izquierdo I y Medina JH 1997; Izquierdo I y McGaugh JL 2000; Izquierdo I et al. 2008).

TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA: paradigma comportamental utilizado.

Para estudiar experimentalmente el aprendizaje y la memoria existen una gran variedad de paradigmas conductuales que se pueden utilizar. Algunos de los más utilizados son los que genéricamente se denominan como pruebas o tareas de evitación inhibitoria. El término «evitación inhibitoria» es empleado para describir pruebas en las que el animal aprende a evitar un acontecimiento nocivo suprimiendo una conducta concreta (inhibición de una actividad innata o de un hábito adquirido).

Se pueden utilizar diversos tipos de evitación inhibitoria como modelo de aprendizaje. Según Bures J et al. (1983) existen cuatro modelos: «tarea de descenso de escalón» o step-down test (SDT), «test de dos compartimentos» (two-compartment test), «supresión de picoteo» (suppression of pecking) y «cruzar a través de» (step-through).

La tarea de evitación inhibitoria comprende un componente asociativo pavloviano conjuntamente con un componente de conducta operante. (Quillfeldt J 2006). Así, en SDT el animal aprende que un lugar específico debe evitarse, ya que se asocia con un evento aversivo. Este tipo de aprendizaje activa eventos bioquímicos en el hipocampo, que son necesarios para la retención del aprendizaje en este paradigma (Izquierdo I y Medina JH 1997).

El SDT es uno de los paradigmas de elección para evaluar el/los proceso/s de memoria debido a las siguientes razones: **a)** se adquiere en cuestión de segundos, pero puede durar meses (Frankland P et al. 2006); **b)** implica la participación del área CA1, que es la región en la que la LTP ha sido mejor estudiada (Izquierdo I y Medina JH 1997; Lorenzini C et al. 1996); **c)** muchos estudios han demostrado similitudes en la naturaleza y los tiempos de los cambios moleculares entre la LTP y la formación de la memoria en esta área (Izquierdo I y Medina JH 1997; Izquierdo I y McGaugh J 2000; Izquierdo I et al. 2008), **d)** es una tarea muy adecuada para la realización de estudios farmacológicos, permitiendo diferenciar según el tiempo de administración del fármaco, los diferentes procesos: adquisición (si se administra previo al entrenamiento), consolidación (luego del entrenamiento) o evocación (antes del test) (Izquierdo I y Medina JH. 1995; Izquierdo I y McGaugh J 2000), **e)** ha permitido describir profundamente la cascada molecular de la memoria en hipocampo (Izquierdo I y Medina JH 1997; Izquierdo I y McGaugh J 2000; Izquierdo I et al. 2008).

La cascada molecular de la memoria en hipocampo se inicia con la liberación del neurotransmisor glutamato, seguido de la activación de los receptores glutamatérgicos tipo alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazole propiónico (RAMP) y la despolarización local de la membrana postsináptica. Esto permite que los iones Mg^{2+} que bloquean los canales de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (RNMDA) se liberen, permitiendo entonces un gran influjo de Ca^{2+} a través de dichos canales y/o de canales voltaje dependientes luego de la activación de dicho receptor (Izquierdo I y Medina J 1995; Nicoll R y Malenka R 1995). El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ está generalmente acoplado a la

activación de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la cual sintetiza óxido nítrico (NO) (Bredt D y Snyder S 1990). Este mensajero retrógradamente aumenta la liberación de glutamato a nivel presináptico. A su vez el incremento de NO generalmente induce un rápido aumento de guanosín monofosfato cíclico (GMP_c) mediante la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) (Izquierdo I y Medina J 1995; Hawkins R et al. 1998). Esta enzima puede unirse a la proteína PSD-95, la cual forma complejos con los RNMDA y nNOS. La nNOS puede localizarse en prolongaciones muy próximas a otras sinapsis, pudiendo modular tanto la liberación de neurotransmisores por parte del terminal presináptico como la respuesta de la célula postsináptica.

El incremento de Ca²⁺ induce la activación, a diferentes tiempos, de numerosas quinasas, tales como la proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina II (CaMKII), la cual promueve la fosforilación de RAMPA y RNMDA (Reymann K 1993; Koga T et al. 1996), la PKC, que fosforila los receptores glutamatérgicos, la proteína quinasa dependiente de GMP_c (PKG) y la proteína quinasa dependiente de AMP_c (PKA), que induce la activación de una familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las ERK 1 y 2, la p38 (llamada de esta forma debido a su peso molecular) y la JNK (quinasa N-terminal c-Jun) (Micheau J y Riedel G, 1999). A su vez el AMP_c formado por activación de PKA, induce la fosforilación de la proteína de unión al elemento que responde a AMP_c (CREB), mediante su unión al sitio CRE del genoma, permitiendo la transcripción de señales para la síntesis de proteínas como neuropéptidos, enzimas, factor de crecimiento celular, etc., necesarias tanto para la memoria como para la generación y/o mantenimiento de la LTP (Izquierdo I y Medina J 1997; Ahmed T y Frey J 2005) (Figura 11).

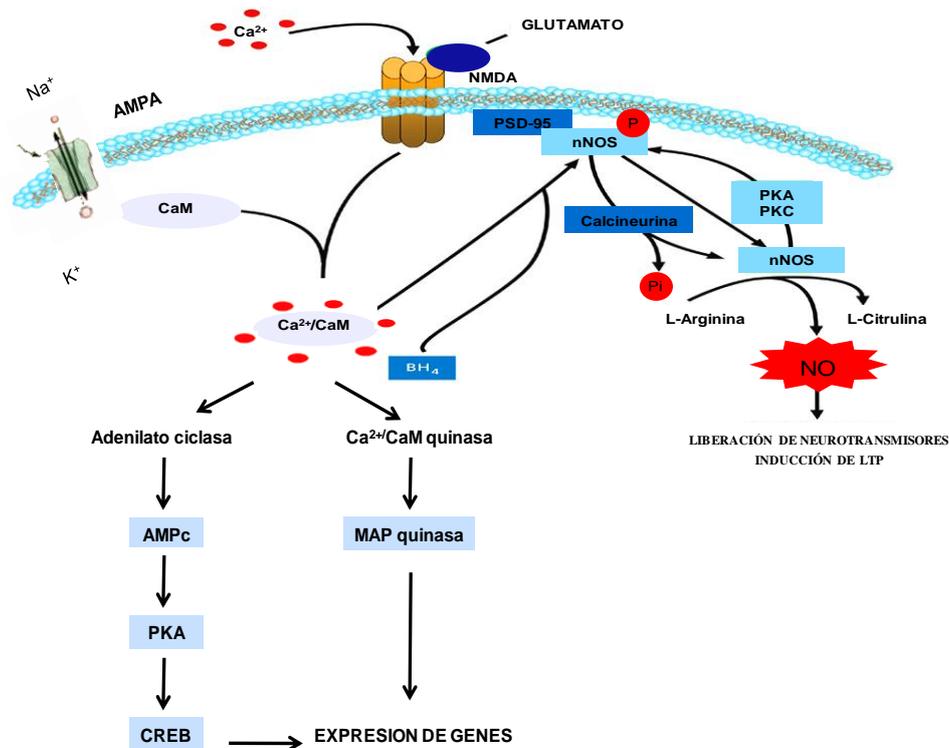


Figura 11. Representación esquemática de los eventos que ocurren en la membrana postsináptica durante los procesos de memoria. La señal (impulso eléctrico) de la neurona presináptica se transmite a la neurona postsináptica mediante la liberación de glutamato, el cual activa receptores específicos, desencadenando una cascada de segundos mensajeros e inducción de LTP.

Tal como se mencionó anteriormente, la cascada bioquímica de la memoria se inicia con la liberación presináptica de **glutamato** y este se une luego a sus receptores. Los mismos, se dividen en dos categorías principales: los **ionotrópicos**, que son canales catiónicos, y los **metabotrópicos**, que activan enzimas intracelulares a través de proteínas G (Nakanishi S 1992; 1994). Según su capacidad de unir agonistas selectivos, se describieron tres clases de receptores ionotrópicos para glutamato: **RNMDA**, **RAMPA** y receptores **KA** (Kainato). La afinidad por su ligando natural, el glutamato, es diferente para los diferentes subtipos de receptores.

Los **RNMDA** son proteínas intrínsecas de membrana heterotetraméricas, compuestas por dos subunidades obligatorias NR1 y dos variables NR2 (NR2A-NR2D) y en algunos casos NR3 (NR3A-NR3B) (Goebel DJ, Poosch MS 1999); requieren de un co-

agonista, la glicina y pueden ser activados además por otros aminoácidos endógenos, como aspartato y homocisteína. Son tetrámeros, formados por el ensamblado de las subunidades individuales cuya diferente combinación produce receptores con diferentes propiedades funcionales (Chazot PL et al. 1994). (Figura 12)

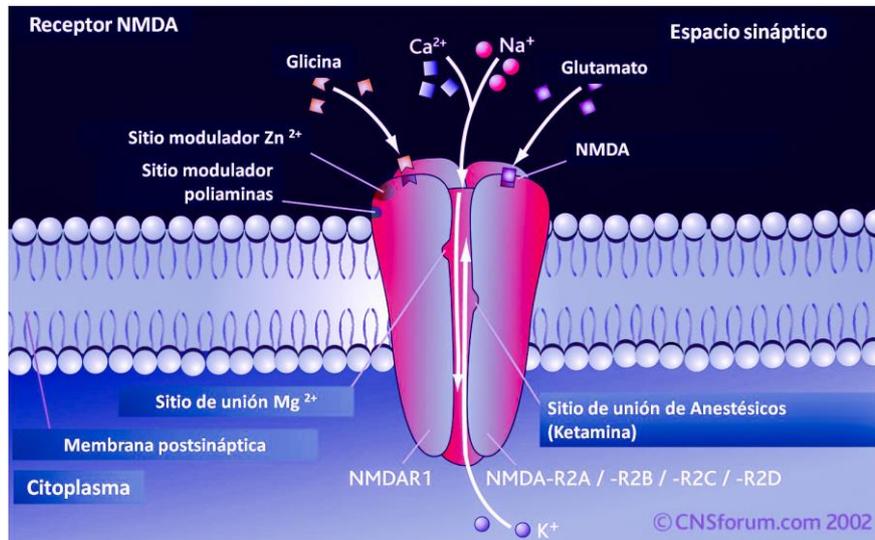


Figura 12. Esquema del RNMDA con 4 subunidades proteicas y sus diferentes sitios de unión.

La subunidad NR1 se expresan ubicuamente en todo el cerebro, aumentando después del nacimiento progresivamente y manteniéndose una expresión importante a lo largo de toda la vida (Laurie DJ et al. 1995). Las subunidades NR2 determinan muchas de las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor. Son necesarias para el ensamblado sináptico del receptor (Wenzel A et al. 1995; 1997). Las distintas subunidades varían su expresión a través del desarrollo. NR2B y 2D se expresan prenatalmente, mientras que NR2A y 2C aumentan rápidamente luego del nacimiento. En adultos NR2A y 2B predominan en estructuras corticales, mientras que 2C y 2D se encuentran en estructuras de cerebro medio y posterior (Monyer H et al 1994; Wenzel A et al. 1995, 1997; Dumas TC 2005). Las subunidades NR3 presentan dos variantes, NR3A y NR3B. Se expresan mucho menos que las NR2 en adultos y varían su expresión a lo largo del desarrollo (Paoletti P y Neyton J 2007; Henson MA et al 2010).

Se ha demostrado que tanto las subunidades NR2A y NR2B del RNMDA desempeñan también papeles importantes en la LTP y el aprendizaje asociativo (Sakimura K et al 1995; Valenzuela- Harrington M et al. 2007). La inducción de LTP requiere de los RNMDA constituidos por subunidades NR2B (Barria A y Malinow R 2005). Las subunidades NR2B mejoran la LTP y la memoria cuando se sobreexpresan en ratones, esto ha sido demostrado en diferentes pruebas conductuales (Tang Y et al 1999, 2001; Cao X et al 2007; Jacobs S y Tsien J 2012; Cui Y et al 2011). Lo contrario ocurre con la eliminación genética de las subunidades NR2B en hipocampo (animales knockout de la subunidad NR2B) resultando en un déficit de memoria y una falla en la LTP (Sprengel R et al 1998; von Engelhardt J et al. 2008).

Además, se han observado cambios en la composición relativa de subunidades del RNMDA bajo determinadas situaciones; por ejemplo en la vejez se produce un cambio de subunidades NR2B a NR2A en los RNMDA (Monyer H et al 1994; Sheng M et al. 1994). Además, NR2B promueve la activación de la nNOS y de la síntesis de NO (Brenman J et al. 1996; Bredt D et al. 1990; Vincent S y Kimura H 1992). NO modula la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica en diferentes estructuras cerebrales, entre ellas, el hipocampo (Prast H y Philippu A 2001; Bartus K et al. 2013).

Han sido definidos una gran variedad de sistemas moduladores centrales y periféricos como neurotransmisores y hormonas que participan en la formación y consolidación de la memoria (Zanatta M et al. 1996; Izquierdo I y Medina J 1995; 1997). En lo que a hormonas y péptidos se refiere, la hormona adrenocorticotropa (ACTH), vasopresina, ocitocina, glucosa, insulina, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I), péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), epinefrina, norepinefrina, son liberadas en el sistema nervioso durante diferentes formas de memoria, pudiendo modular dichos procesos (Gold P 1995; Izquierdo I y Medina J 1995; Mainardi M et al. 2015). Todas estas moléculas han mostrado tener efectos sobre los procesos de memoria y la generación y/o mantenimiento de la LTP hipocampal (Burgard E et al. 1993; Izquierdo I y Medina J 1995; Mainardi M et al. 2015).

PARTICIPACIÓN DE GRELINA EN PROCESOS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

La historia de Gr y memoria comienza en 1997, cuando el grupo de Guan (Guan X et al. 1997) describió que el ARNm que codifica a los GHS-R, además de estar presente en hipotálamo, se expresaba también en otras regiones del cerebro de rata, tales como el hipocampo. De este modo, revelaron que el hipotálamo, hipocampo e hipófisis son las regiones con la expresión más abundante de ARNm para este receptor. Así estos receptores fueron identificados en hipocampo cuando aun no se había descubierto Gr ni sus efectos biológicos. En 1999 el grupo de Kojima (Kojima M et al. 1999) descubrió el ligando específico para este receptor huérfano, y lo llamaron “Grelina”.

Tomando en cuenta los resultados del grupo de Guan, acerca de la distribución de los receptores de Gr, y el papel fundamental del hipocampo en el aprendizaje y la memoria, en el año 2002, nuestro laboratorio inició la investigación del posible rol de este péptido en procesos de aprendizaje y memoria en animales de experimentación. En los primeros experimentos, Gr se infundió intracerebroventricular (icv) en ratas y se analizó el desempeño de las mismas en las tareas de campo abierto, laberinto elevado en cruz, y evitación inhibitoria (SDT). La administración de Gr aumentó la latencia para descender del escalón en el SDT, de una manera dependiente de la dosis, mostrando por primera vez que Gr aumenta la retención de la memoria, posiblemente a través de un mecanismo dependiente de hipocampo (Carlini VP et al. 2002).

*Es ampliamente conocido que, para afirmar que una hormona de origen periférico induce efectos a nivel del SNC, se requiere también demostrar que el péptido sintetizado periféricamente es capaz de atravesar la BHE, alcanzar diferentes estructuras centrales y unirse a sus receptores específicos. Estudios realizados por Diano S et al. (2006) reportaron que **Gr periférica entra al hipocampo y se une a receptores** en neuronas de la formación hipocampal.*

Los estudios que se realizan empleando la administración icv de drogas o fármacos, resultan muy útiles para indicar o confirmar los efectos a nivel del SNC de estos agentes (Izquierdo I y Medina JH 1995), pero no aportan información acerca de las áreas específicas de acción en el SNC, es decir, dónde y cuándo ocurren los procesos. En este contexto, microinfusiones localizadas en regiones específicas del cerebro proporcionan información relevante acerca de dónde se producen los procesos que se investigan. Así, en el año 2004, **Gr fue infundida en estructuras tales como hipocampo, amígdala y DRN**, a fin de identificar los posibles sitios extra-hipotalámicos para los efectos de Gr que pudieran justificar el aumento de la retención de la memoria inducido por el péptido (Carlini VP et al. 2004). Estas estructuras se eligieron teniendo en cuenta que las mismas forman parte del sistema límbico, que están extensamente interconectadas con el hipotálamo y que participan de la regulación de la ingesta, la expresión de la ansiedad y la memoria (Izquierdo I et al. 1992; Quillfeldt J et al. 1996; Kalra S et al. 1999). Los resultados mostraron **efectos diferenciales del péptido en esas estructuras en relación a la memoria, ingesta, y ansiedad**. La administración de Gr en estas tres regiones aumentó significativamente la retención de memoria, de una manera dependiente de la dosis. En cuanto a la ingesta de alimentos, también aumentó en relación con ratas controles, cuando Gr se infundió en hipocampo y DRN, pero no en amígdala (Carlini VP et al. 2004). Por otra parte, la suposición de que el aumento en el tiempo de latencia en el SDT podría atribuirse a un efecto ansiogénico del péptido ha sido descartado, debido a que se demostró que dosis de Gr que mejoran la retención de la memoria en ratas, no producen ningún comportamiento ansiogénico (Carlini VP et al. 2004).

En lo que respecta a modelos de **ratones deficientes (knockout) para Gr**, los mismos presentan un **reducido número de espinas sinápticas** en hipocampo y un **deterioro en el rendimiento en pruebas de memoria**, como la de reconocimiento de objetos nuevos, no obstante, estos parámetros son revertidos con la administración subcutánea de Gr (Diano S et al. 2006).

Por otro lado, se estudió también en nuestro laboratorio, si la mejora de la memoria inducida por Gr, se podía visualizar en animales que presentan un déficit cognitivo como ocurre en animales sometidos a restricción calórica (ratones sometidos a 28 días de restricción de alimentos en un 50%) (Carlini VP et al. 2008). Se analizó esta posibilidad sometiendo a los mencionados animales al paradigma de reconocimiento de objetos nuevos. Esta tarea se diferencia de la tarea de evitación inhibitoria por el tipo de información que debe ser recordada, ambos paradigmas evalúan la retención de la memoria, pero el SDT evalúa una memoria de tipo aversiva, mientras que la prueba de reconocimiento de objetos es de tipo no aversiva, ya que evalúa sólo la capacidad para reconocer objetos nuevos. Se demostró entonces, que la administración de **Gr fue capaz de revertir el déficit cognitivo** presente en estos ratones con restricción alimentaria crónica, y además que **el efecto facilitador del péptido sobre la retención de la memoria se observa independientemente del test utilizado**. Además, diferentes investigadores han demostrado que dietas con un alto contenido de grasa y de glucosa, lo cual inhibe la secreción de Gr (Beck B et al. 2002; Lomenick JP et al. 2009), deterioran la plasticidad sináptica y la memoria espacial dependientes de hipocampo (Wu A et al. 2003; Stranahan A et al. 2008). Por otro lado, la restricción calórica, la cual resulta en un aumento en los niveles circulantes de Gr (Lutter M et al. 2008), mejora la deficiencia observada en procesos cognitivos relacionada con el envejecimiento (Witte A et al. 2009), y facilita el aprendizaje y la plasticidad sináptica (Fontán-Lozano A et al. 2007).

Por otra parte, evidencias apoyando lo descrito anteriormente, demostraron que la administración por vía oral o subcutánea de dos agonistas no peptídicos del receptor de Gr (GSK894490A y CP-464709-18), fueron capaces de atravesar fácilmente la BHE y desencadenar efectos pro-cognitivos en tareas de memoria, como reconocimiento de objetos nuevos y aprendizaje espacial en ratas (Atcha Z et al. 2009). En los últimos años varios estudios han demostrado que Gr aumenta la retención de la memoria en roedores, y que el hipocampo participa en este efecto (Chen L et al. 2011, Li E et al. 2013).

En el año 2010 se demostró que la administración de Gr intrahipocampal antes de la sesión de entrenamiento en el SDT, pero no el día del test (llevada a cabo 24 h después del entrenamiento), mejora la retención de la memoria a largo plazo en ratas (Carlini et al. 2010). Estos hallazgos demostraron que **Gr modula eventos moleculares y/o celulares de señalización implicados en la adquisición y/o consolidación de la memoria**, pero no en la evocación de la misma (Carlini VP et al. 2010 a).

Por otra parte, estudios electrofisiológicos mostraron, que la **infusión de Gr en la región CA1** de hipocampo de ratas, **disminuye los valores del umbral para generar LTP** en DG hipocampal (Carlini VP et al. 2010).

En relación con la vía de señalización del péptido, se demostró que **Gr aumenta la actividad de la enzima nNOS** de manera dependiente de la dosis, lo que sugiere la participación de la vía nNOS/NO en los efectos del péptido sobre la retención de la memoria (Carlini VP et al. 2010).

Se ha demostrado también que la administración periférica de **Gr estimula la proliferación y diferenciación de neuronas en hipocampo** (Moon M et al. 2009). Corroborando estos hallazgos, se detectó la expresión de GHS-R1a en células progenitoras del hipocampo, confirmando la participación de Gr en la neurogénesis de esta región (Gahete M et al. 2011).

También se observó que **Gr posee acciones neuroprotectoras**, como por ejemplo, **inhibe el estrés oxidativo** (Kheradmand A et al. 2010), **la apoptosis** (Delhanty PJ et al. 2007), **la neuroinflamación** (Erşahın M et al. 2011), **la disfunción mitocondrial** (Zhang Q et al. 2012) y **la excitotoxicidad glutamatérgica** (Lim E et al. 2011), tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, estos efectos neuroprotectores de Gr se han descrito en modelos experimentales de Parkinson (Jiang H et al. 2008), **esclerosis múltiple** (Theil M et al. 2009), **epilepsia** (Obay B et al. 2008) y, recientemente, **de Alzheimer** (Moon M et al. 2011).

Con respecto a la enfermedad de Alzheimer, se observó que la producción de Gr, así como la expresión de su receptor GHS-R1a y de la enzima GOAT, se reducen en el lóbulo temporal de estos pacientes, en comparación con individuos controles de edades similares

(Gahete M et al. 2011). Estos resultados sugieren que esta reducción en las concentraciones del péptido en el SNC puede contribuir a la pérdida neuronal y a los déficits cognitivos observados en esta enfermedad. Reforzando estos hallazgos clínicos, Moon M et al. (2011) han demostrado que la administración ip de Gr (80 mg/kg) fue capaz de mitigar el déficit cognitivo y las respuestas inflamatorias inducidas por la infusión intrahipocampal del péptido en un modelo de ratones A β 1-42 .

Por otra parte, ha sido postulado que **la activación de los GHS-R1a probablemente module la liberación, síntesis o metabolismo de ciertos neurotransmisores** tales como glutamato, dopamina y serotonina, los cuales intervienen en los procesos de memoria. Se ha demostrado recientemente que el receptor de Gr es co-expresado en neuronas que expresan receptores de dopamina, y que un subconjunto de GHS-R1a, heterodimerizan con estos receptores, participando en la regulación de la supresión de la ingesta inducida por dopamina (Kern A et al. 2012).

Varias hormonas y péptidos involucrados en la regulación de la ingesta y el control del metabolismo, han emergido como importantes moduladores de numerosas funciones cerebrales no relacionadas directamente con el metabolismo. Se ha demostrado que moléculas tales como insulina, IGF-1, leptina, Gr, GLP-1, impactan en la función hipocampal, afectando propiedades tales como la plasticidad sináptica (LTP, LTD), la plasticidad estructural (espinas dendríticas, neurogenesis), llevando así a modificaciones en el desempeño cognitivo. A su vez, en los últimos años, ha sido puesto de manifiesto la relevancia e interrelación de diferentes desregulaciones metabólicas en patologías neurodegenerativas que cursan con déficit cognitivo (Mainardi M et al. 2015).

SEROTONINA Y GRELINA

El sistema serotoninérgico está implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos y de comportamiento, tales como: estado de ánimo, aprendizaje, memoria, comportamiento sexual, agresión, respuestas al estrés, sueño, termorregulación e ingesta (Buhot M et al. 2000; Struder y Weicker 2001). Las fibras 5-HTérgicas se originan en el NDR y mediano del rafe (NMR) y proyectan hacia todas las regiones del hipocampo encontrándose la densidad más alta en la capa molecular del subículo, en CA1 y en el stratum molecular y radiado de CA3 (Flores J et al. 2004). Otras proyecciones se dirigen al hipotálamo, donde la liberación de 5-HT modula la ingesta (Ohliger-Frerking P et al. 2002), hacia al núcleo paraventricular (PVN), donde se localizan neuronas productoras de CRF y hacia la amígdala, la cual media respuestas emocionales e integra las influencias neuromodulatorias que regulan la consolidación de algunas formas de memoria. (McGaugh JL 2002).

También ha sido demostrada la importancia del sistema serotoninérgico en la regulación de la ingesta y la saciedad. Individuos que regulan los niveles de 5-HT normalmente, adquieren saciedad más rápidamente y muestran un mejor control sobre la búsqueda de carbohidratos, inhibiendo la ingesta de azúcar más eficientemente (Feijo F et al. 2011). Diferentes drogas que tienen como blanco el sistema serotoninérgico central, han sido desarrolladas para inducir saciedad y reducir la ingesta, así drogas que inhiben la recaptación de 5-HT, han sido usadas como supresores del apetito (Silva RC et al. 2003). Tal como se mencionó previamente Gr, a través de sus receptores GHS-R1a, participa fuertemente en el control de la ingesta y el balance energético, por lo cual diversos investigadores han intentado buscar relaciones e interacciones entre este neurotransmisor y la hormona Gr. Se ha demostrado que Gr inhibe la liberación de 5-HT a partir de sinaptosomas hipotalámicos de rata (Brunetti L et al. 2002), sugiriéndose que el efecto orexigénico del péptido podría ser mediado por la inhibición de la liberación de 5-HT.

Teniendo en cuenta los resultados antes mencionados, es razonable pensar que la disminución de la liberación de 5-HT observada en hipotálamo, representa un mecanismo que podría extenderse a otras estructuras como el hipocampo.

Datos recientes han demostrado modificaciones en los niveles de ARNm de receptores serotoninérgicos, en amígdala y NDR, después de la administración aguda de Gr a nivel central (Hansson C et al. 2014). Por otro lado, la administración directa de 5-HT en hipotálamo, atenúa el efecto orexigénico de Gr en ratas (Currie PJ et al. 2010).

Resultados previos en nuestro laboratorio, demostraron que el tratamiento de animales con un inhibidor de la recaptación de 5-HT, como fluoxetina, previo a la administración de Gr (icv o intrahipocampal), inhibe el incremento en la ingesta, como así también el efecto facilitador del péptido sobre la retención de la memoria, sugiriendo que estos efectos dependerían de la disponibilidad de 5-HT (Carlini VP et al. 2007).



OBJETIVOS

Los presentes objetivos están planteados teniendo en cuenta los antecedentes previamente expuestos y específicamente que: a) trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que la administración de Gr icv o en hipocampo induce una facilitación en la retención de la memoria, b) la cascada bioquímica de la memoria se inicia con la liberación del neurotransmisor Glutamato, c) la activación de los receptores glutamatérgicos NMDA es considerada el disparador inicial para la plasticidad sináptica hipocampal y para la formación de la memoria, d) diferentes ensamblajes de las subunidades del RNMDA en la membrana postsináptica, resultan en diferentes propiedades funcionales, e) cambios en la composición relativa de subunidades del RNMDA bajo determinadas situaciones modifican la eficiencia sináptica, f) las subunidades NR2B son requeridas para la inducción de la LTP, la cual es considerada un correlato celular del aprendizaje y la memoria.

OBJETIVO GENERAL

Los experimentos presentados en este trabajo de investigación básica tienen como objetivo investigar el posible sustrato neurobiológico implicado en los efectos de la hormona Gr a nivel del SNC, fundamentalmente sobre la facilitación de la memoria. Se pretende aportar nuevas evidencias relacionadas con el/los mecanismos que pudieran justificar la facilitación en la consolidación de la memoria inducida por el péptido a nivel hipocampal.

Individualizar la/s etapa/s de la cascada bioquímica de la memoria sobre la cual/es el péptido ejerce su efecto modulador podría contribuir, no solo a definir el papel funcional de Gr en la memoria, sino también, favorecer al esclarecimiento de estudios recientes que presentan a Gr como un nuevo e innovador agente terapéutico de potencial uso en patologías neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, entre otras.

Nos abocaremos por un lado, a los procesos que se activan tempranamente en la cascada bioquímica de la memoria, tales como la liberación de glutamato, la activación de receptores glutamatérgicos, específicamente la participación de la subunidad NR2B del receptor NMDA. Con este fin se utilizarán paradigmas conductuales, bloqueo farmacológico de receptores, determinaciones bioquímicas, técnicas inmunohistoquímicas, y análisis de parámetros electrofisiológicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Con el fin de identificar procesos y mediadores moleculares implicados en la facilitación de la memoria inducida por Gr en hipocampo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

I. Determinar si el efecto potenciador de Gr sobre la retención de la memoria implica la modulación del proceso de consolidación. Para tal fin se determinará la ventana temporal de dicho efecto.

II. Investigar si los efectos inducidos por el péptido sobre la retención de la memoria y sobre la plasticidad sináptica son dependientes de la activación de su receptor específico (GHS-R1a).

III. Determinar el efecto de Gr sobre la liberación de Glutamato endógeno evocado por 4-AP a partir de sinaptosomas hipocampales.

IV. Investigar el efecto de la administración del péptido sobre la expresión de la subunidad NR2B de los RNMDA, y sobre los efectos conductuales y electrofisiológicos en animales pretratados con un antagonista de la subunidad NR2B, Ro 25-6981.

V. Determinar el efecto de Gr sobre la liberación de [³H] 5-HT de rebanadas de hipocampo.



MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

En este estudio se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar (270-300 g) criadas en el bioterio del Departamento de Farmacología (IFEC-CONICET) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Los animales se alojaron en grupos de 3 ó 4 individuos en cajas de plástico estándar de laboratorio (Plexiglas), con libre acceso al agua y al alimento (dieta balanceada para ratas y ratones de laboratorio). Los animales fueron albergados en salas con ciclo de 12 h de luz/oscuridad (encendido de luz de 7:00 a 19:00 h) y con temperatura constante de 22 ± 2 °C. Los procedimientos experimentales fueron realizados entre las 9:00 y 12:00 h. Los animales fueron habituados al contacto con el experimentador; para ello fueron trasladados a una habitación diferente, manipulados y luego retornados a sus cajas y a su sala de alojamiento común. Este procedimiento se repitió los 6 días posteriores a la cirugía, antes de iniciarse los experimentos. Las ratas fueron asignadas al azar a los distintos grupos experimentales y cada una fue utilizada una sola vez.

Todos los procedimientos y manipulaciones se llevaron a cabo de acuerdo con las normas establecidas por la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de la Salud (NIH - National Institute of Health) de Estados Unidos de América, aprobada por el comité de cuidado y uso de animales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.



Rata Wistar adulta

Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales utilizados.

CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Todos los animales utilizados en este estudio fueron implantados bilateralmente con cánulas guías en el área CA1 del hipocampo dorsal mediante técnicas estereotáxicas. Cada animal fue anestesiado con una mezcla de anestésico miorrelajante compuesta de Ketamina (55 mg/kg) y Xilazina (11 mg/Kg) mediante una inyección ip y colocado en un aparato estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, IL) con la barra de incisivos a -3,3 mm. Se realizó un corte en el cuero cabelludo, se dejó el cráneo expuesto y se tomaron las coordenadas según la posición del Bregma. Se realizaron dos orificios en el cráneo para implantar las cánulas guías de acero inoxidable (22 gauge) de 9 mm longitud. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con un tornillo y acrílico dental. Las coordenadas para el área CA1 del hipocampo dorsal fueron tomados del atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2007) siendo las siguientes: antero posterior (AP), -3.3 mm; lateral (L), ± 2.0 mm; dorso ventral (DV), -2.5 mm. Los animales fueron retirados del estereotáxico y colocados en su caja hogar, con supervisión constante hasta su recuperación. Los días posteriores a la cirugía, los animales fueron manipulados y se simuló la microinyección con el fin de minimizar las respuestas no específicas a este procedimiento durante el experimento. Los animales se dejaron recuperar alrededor de 7 días antes de iniciar los experimentos.



Aparato estereotáxico



Foto cirugía. Rata implantada

MICROINYECCIÓN INTRACEREBRAL

Para la realización de la microinyección, los animales fueron cubiertos con un paño, suavemente sujetos y se introdujeron los inyectores. Se utilizaron como inyectores agujas de acero inoxidable (30 gauge) de 10 mm de longitud que sobrepasaban la cánula guía en 1 mm. La microinyección fue realizada mediante la conexión del inyector a través de un tubo de polietileno (PE 10, Becton Dickinson, MD) a una jeringa de 10 μ l (Hamilton, Reno, NV) montada en una bomba de microinyección (Stoelting, Illinois, USA). Cada rata fue inyectada bilateralmente con 0,5 μ l de solución con una velocidad de flujo de 0,5 μ l/min. Para permitir la difusión de la droga, los inyectores permanecieron en las cánulas guías durante un min adicional.



Inyector conectado a una jeringa Hamilton



Inyección a través de las cánulas

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Al finalizar los experimentos conductuales, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de hidrato de cloral 16 % o en una cámara de CO₂. Los cerebros fueron extraídos y luego fijados por inmersión en una solución de formaldehído al 4 % al menos por 3 días. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 60 μ m de espesor mediante un crióstato (Leica, Nussloch, Alemania), en los que se examinó el sitio de infusión y la

presencia/ausencia de hemorragia y/o necrosis utilizando una lupa binocular (Arcano). Los sitios de inyección fueron comparados con las láminas del atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (2009) (Figura 13). Los datos correspondientes a los animales que presentaron una localización incorrecta de las cánulas o daño tisular observable fueron excluidos del análisis de resultados.

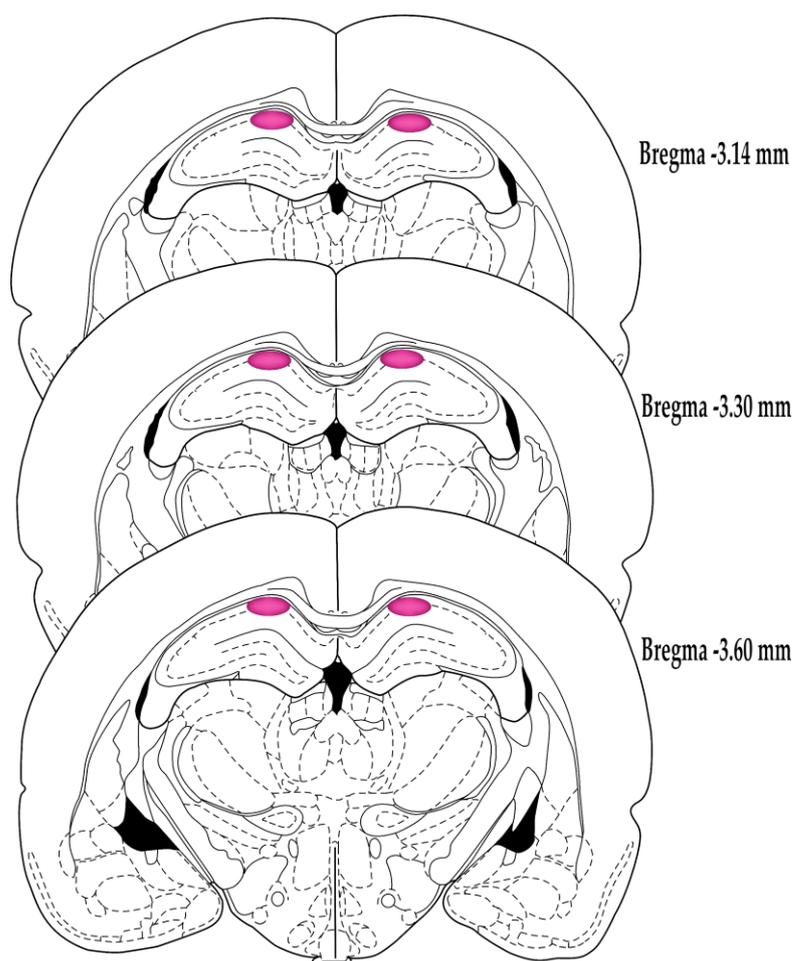


Figura 13. Ubicación de los sitios de inyección en el área CA1 del hipocampo dorsal. Láminas representativas de los sitios de inyección de tratamientos de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson. Las marcas corresponden al sitio de inyección de los diferentes tratamientos utilizados para los experimentos.

DROGAS

Para el desarrollo de los experimentos se administraron las siguientes drogas: Grelina (SC1356) de Polypeptide; R-(R,S*)-α-(4-hydroxyphenyl)-β-methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidine propranolol (Ro 25-6981 clorhidrato) (R7150) y [DLys3]-péptido 6 liberador de hormona de crecimiento (D-Lys3-GHRP-6) (G4535) de Sigma-Aldrich.*

Se utilizó solución salina estéril como control, ya que fue el medio de dilución de Gr, D-Lys3-GHRP-6 y Ro 25-6981, y porque no se encontraron diferencias a nivel conductual ni molecular con su uso, respecto a animales que no reciben la administración de la misma.

ADMINISTRACIÓN

Los animales fueron infundidos bilateralmente en hipocampo dorsal con salina o las diferentes drogas en un volumen de 0,5 µl/lado. En los casos que correspondiese todos los grupos experimentales recibieron dos inyecciones administradas con 5 min de diferencia entre ellas. Cuando se administró salina o una sola droga la otra inyección fue realizada con salina. Las dosis utilizadas fueron seleccionadas en base a estudios previos y a pruebas realizadas en el laboratorio.

PURIFICACIÓN DE SINAPTOSOMAS

Los animales fueron transferidos a una sala e inmediatamente sacrificados por decapitación. Sus cerebros fueron removidos rápidamente y colocados sobre hielo. Se realizó la disección de los hipocampos y se obtuvo un pool de homogenatos (3 animales). Los sinaptosomas se purificaron en un gradiente discontinuo de Percoll según la técnica descrita por Dunkley et al. (1988). El tejido fue homogeneizado en Buffer de Gradiente (BG) pH 7,4 (0,32 M sacarosa, 1 mM EDTA, 0,25 mM DTT) a 4 °C y posteriormente centrifugado a 2.000 xg durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue centrifugado a 9.500 xg por 14 min a

4 °C. El sedimento resultante fue resuspendido en 5 ml de BG. Esta suspensión se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll, preparado en BG y formado por bandas de 3 ml de Percoll al 3 %, 10 % y 23 %, a pH 7,4. Los gradientes fueron centrifugados a 25.000 xg durante 14 min a 4 °C y después los sinaptosomas fueron tomados de la interfase formada por las bandas de Percoll al 10 % y al 23 %. La muestra fue diluida a un volumen final de 20 ml con medio HBM pH 7,4 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucosa, 10 mM HEPES), y centrifugada a 22.000 xg por 14 min a 4 °C. El sedimento resultante fue resuspendido en 1 ml de medio HBM y a continuación fue determinado el contenido de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay Kit; Hercules, CA). Las alícuotas fueron mantenidas en hielo hasta su utilización (Figura 14).

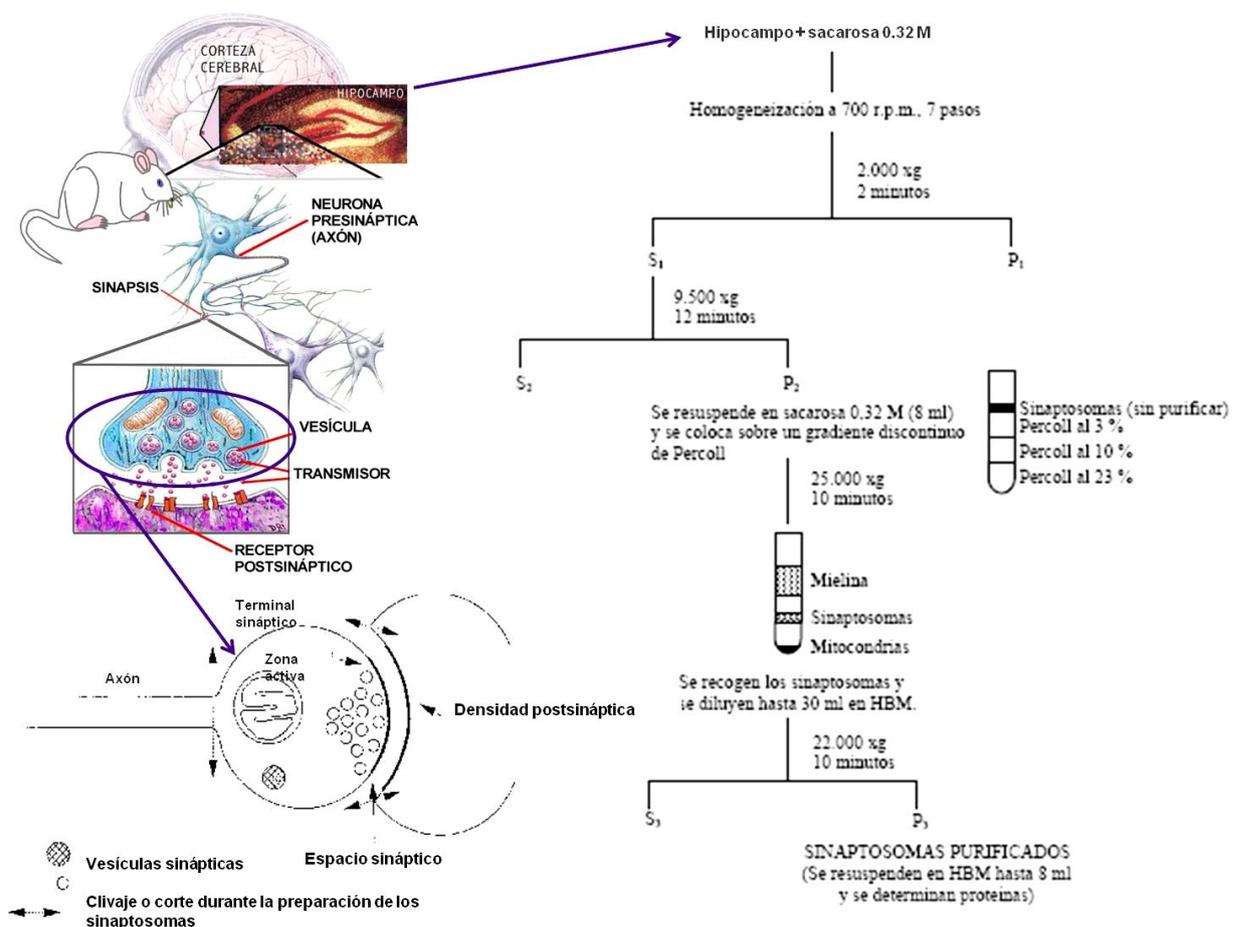


Figura 14. Esquema de la obtención de sinaptosomas purificados.

ENSAYO DE LIBERACIÓN DE GLUTAMATO

Se realizó según la técnica descrita por Nicholls y col. (Nicholls et al., 1987; Vilcaes et al. 2009). La muestra de sinaptosomas fue trasvasada a una cubeta de cuarzo para fluorescencia mantenida a 37 °C en un fluorómetro. Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: NADP⁺, CaCl₂ y 2 min después la enzima L-glutamato dehidrogenasa. Luego de 5 min se agregó 4-aminopiridina (4-AP) para inducir la liberación del neurotransmisor. Los sinaptosomas se incubaron en presencia de Gr o HBM (control) 2 min antes de la adición de 4AP. Los cambios en la fluorescencia debidos a la producción de NADPH (excitación, 330 nm; emisión, 460 nm) reflejaron la liberación de glutamato, el cual es convertido a α -cetoglutarato por la enzima L-glutamato dehidrogenasa mediante la reducción de NADP⁺ a NADPH. Un estándar de glutamato fue adicionado al final de cada experimento para calcular la liberación de glutamato como la relación de nanomoles de glutamato por mg de proteína sinaptosomal (Sihra et al. 1992) y además, como porcentaje del total de la liberación de glutamato con respecto al control, teniendo en cuenta el control como 100%. Los datos se obtuvieron a intervalos de 1-s. 4-AP bloquea canales de K⁺ que participan en la repolarización de la membrana, causando una desestabilización del potencial de membrana y la apertura de canales de Na⁺. Como consecuencia, se generan potenciales de acción espontáneos con la consiguiente apertura de canales de Ca²⁺ y liberación de neurotransmisores (Tibbs et al. 1989).

La cuantificación de la liberación de glutamato se realizó mediante el uso de los valores obtenidos a los 10 min del periodo experimental y expresado como media \pm ES, y también mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) usando el software "Origin8" con el fin de analizar el total de Glutamato liberado durante 10 min del experimento. Para ambos parámetros, cada valor se obtuvo de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

Todos los datos fueron expresados como la media \pm ES y los resultados fueron analizados utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA). En el caso de la

existencia de diferencias significativas, se realizó el test de comparación post hoc “One sample t test” o prueba t para comparaciones con un valor teórico (100). Las diferencias con un valor de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Los datos se analizaron con el software estadístico “Graphpad prisma 6”.

Glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.3), NADP +, y 4AP se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Percoll se obtuvo de Pharmacia (Peapack, NJ, EE.UU.). Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico, comercializados en Argentina.

PRUEBA DE EVITACIÓN INHIBITORIA: STEP DOWN TEST (SDT)

El SDT ha sido ampliamente utilizado para el estudio de la consolidación de la memoria. El mismo, ha sido durante mucho tiempo, uno de los modelos favoritos para los estudios bioquímicos y farmacológicos de la memoria. El aprendizaje en el SDT se basa en la formación de una asociación entre bajar de una plataforma con un estímulo aversivo, como un choque eléctrico en las patas, estableciendo una memoria a largo plazo expresada como un aumento en el tiempo de latencia para bajar de la plataforma el día del test.

Las ratas fueron sometidas a un entrenamiento en el SDT. El aparato de entrenamiento es una caja de plástico de 50 × 25 × 25 cm con una plataforma de 2,5 cm de alto y 7,0 cm de ancho, colocada a la izquierda de la caja de entrenamiento. La base del aparato consiste en barras de acero inoxidable en paralelo, con diámetro de 0,1 cm, espaciadas 1,0 cm una de la otra. Los animales fueron colocados en la plataforma, y se midió el tiempo de latencia para bajar de la plataforma (en segundos), mediante la colocación de las cuatro patas sobre la grilla.



**Prueba de Evitación Inhibitoria:
Descenso de una plataforma aislada**

En la sesión de entrenamiento, inmediatamente después de bajar del escalón, las ratas recibieron un shock eléctrico en las patas de 0,4 mA, durante 2-s, y luego fueron retiradas inmediatamente de la caja de entrenamiento y colocadas en sus cajas habituales. El test de retención de la memoria se llevó a cabo 24 h después del entrenamiento con el fin de evaluar la memoria a largo plazo. Las sesiones de test fueron idénticas a las sesiones de entrenamiento, a excepción de que no se les administró un shock eléctrico. Se impuso un límite máximo de 180 s para las mediciones del día del test. Un incremento en el tiempo de latencia fue tomado como medida de retención de la memoria (Figura 15).

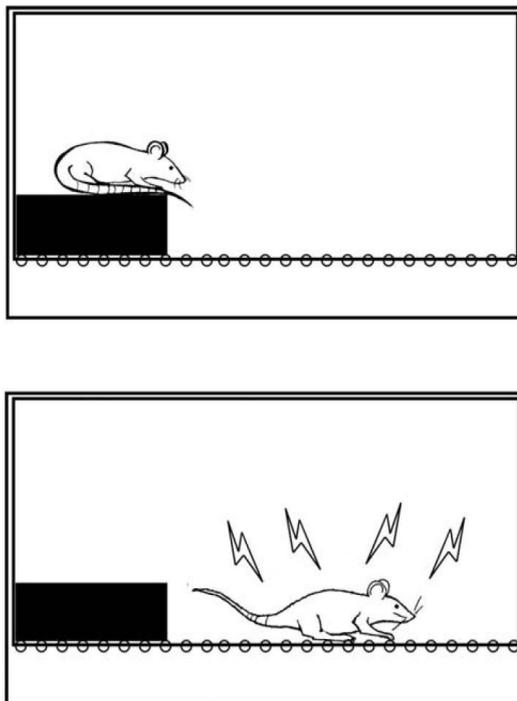


Figura 15. Aprendizaje de evitación inhibitoria o SDT. Este entrenamiento dura sólo unos segundos y genera una memoria robusta cuya evocación es dependiente del hipocampo. Durante la sesión de entrenamiento, la rata es colocada en la plataforma y la explora por algunos segundos. Luego el animal desciende a la grilla donde recibe un shock eléctrico moderado en las patas. Durante la sesión de test (en este trabajo 24 h después del entrenamiento), el animal es colocado nuevamente sobre la plataforma y se mide el tiempo que tarda en descender a la grilla.

Dado que las variables del SDT no siguen una distribución normal, ellas se expresaron como mediana (con su rango intercuartil) y fueron analizadas mediante un test no paramétrico (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis o test de Scheirer-Ray-Hare, una extensión del test de Kruskal-Wallis, según corresponda). El test de Scheirer-Ray-Hare se realizó en el Software “Analítica Predictiva” (versión 19, SPSS Inc, Chicago, IL, EE.UU.) con cálculos adicionales y el uso de una tabla de Chi-cuadrado para determinar el valor de p. El resto de los cálculos estadísticos fueron realizados con el programa “Graphpad prisma 6”. Se fijó un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ para estos datos. Se emplearon los tests post hoc de Dunn o Mann-Whitney con corrección de Bonferroni.

ELECTROFISIOLOGÍA

Con el fin de evaluar si los cambios en la retención de memoria inducida por la administración intrahipocampal de Gr podrían ser correlacionados con cambios en la excitabilidad del DG hipocampal, algunos animales fueron sacrificados para realizar experimentos electrofisiológicos inmediatamente después de la sesión de test en step down (24 h después del entrenamiento y administración Gr). Para evitar variaciones provocadas por los ritmos circadianos o factores de estrés no específicos, las ratas fueron sacrificadas entre las 11:00 am y el mediodía (Teyler y Di Scenna 1987).

El hipocampo fue disecado, se obtuvieron rebanadas transversales de aproximadamente 400 μm de espesor, que se mantuvieron en una cámara de almacenamiento que contiene solución de Krebs estándar (NaCl, 124.3 mM; KCl, 4.9 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.3 mM; H_2KPO_4 , 1.25 mM; HNaCO_3 , 25.6 mM; glucosa, 10.4 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.3 mM; Sigma, Argentina) saturada con 95% de O_2 y 5% CO_2 . Al comienzo de los experimentos, una sola rebanada se colocó en una cámara de registro (BSC-BU Harvard Apparatus) perfundida con la solución estándar de Krebs saturada con 95% de O_2 y 5% CO_2 . La velocidad de perfusión fue de 1,6 ml/min, y la temperatura de la solución del baño se mantuvo a 28 °C con un controlador de temperatura (TC-202A Harvard Aparatos). Los potenciales de campo postsinápticos excitatorios (fEPSPs-del inglés- field Excitatory Post Synaptic Potentials) fueron evocados con un electrodo de estimulación colocado en el tracto perforante (PP -del inglés- perforant pathway) y conectado a un generador de pulsos (A310 Accupulser-World Precision Instruments Inc., EE.UU.), y el electrodo de registro fue colocado en la capa de células granulares del DG, y conectado a un amplificador que envió las señales a un osciloscopio donde se observaron y registraron los fEPSPs generados (Figura 16 A). Los fEPSP que respondieron a pulsos de 0.2 Hz (0.5 ms; 10 mA cada uno) fueron medidos cada 5 min durante un período de 20 a 30 min de tiempo (para tomar el registro basal). Sólo los cortes que mostraron una respuesta estable fueron incluidos. Una

vez que no se observaron otros cambios en la amplitud de fEPSPs, se aplicaron uno de los dos protocolos de estimulación. Ambos protocolos se analizaron en cada animal.

En el **primer protocolo (protocolo de estimulación de frecuencia variable)**, fueron empleados diferentes valores de frecuencias de estimulación con el fin de determinar el valor mínimo para generar LTP (llamamos a esto el valor "umbral"). El mismo, consistió en un tren de pulsos de 2 segundos de duración (0.5 ms; 10 mA cada uno), de frecuencia creciente (5-200 Hz), que fue otorgado al PP, por el generador de pulsos A310 accupulser (World Precision Instruments Inc.). Se considera que la LTP fue generada cuando se produce un aumento en algún parámetro del fEPSP superior al 30% con respecto a los mismos parámetros del fEPSP obtenidos previo al estímulo (basal), y que persiste durante 60 min (Figura 16 B). Una vez que se generó LTP, ningún otro estímulo fue otorgado y se continuó registrando el fEPSP a 0.2 Hz para evaluar la persistencia del incremento observado en el fEPSP al menos durante una hora.

Diez minutos después de cada estímulo, a una determinada frecuencia se realizó un nuevo registro de la señal a 0.2 Hz. Si no se observa LTP 20 min después de una frecuencia de estimulación determinada, otra rebanada hipocampal se utilizó para probar un estímulo del siguiente valor de frecuencia. Los resultados se expresaron como media del umbral (Hz) \pm el error estándar (ES) y se analizaron mediante ANOVA de una vía.

Para el **segundo protocolo**, la LTP se generó mediante el **paradigma clásico de tetanización o protocolo de estimulación supramáxima (HFS)**, que consiste en 3 trenes de pulsos de 0.5 ms y frecuencia de 100 Hz con una duración de 2 segundos cada uno. Dicho protocolo se utilizó con el objeto de demostrar si un estímulo de alta frecuencia es capaz de generar LTP en todos los grupos experimentales y si existen variaciones en el grado de potenciación de los fEPSP generados entre los distintos grupos experimentales.

Los resultados son expresados como porcentaje de cambio de amplitud del fEPSP relacionado con el basal \pm ES y analizados por ANOVA de medidas repetidas (tiempo).

Para ambos protocolos se estableció un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, y se empleó un test post hoc de Student-Newman-Keuls.

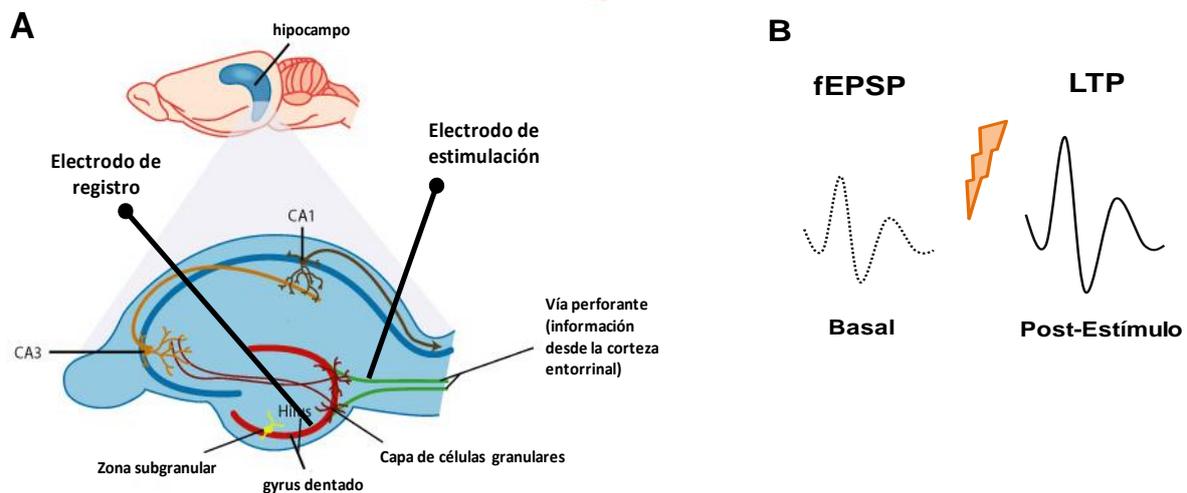


Figura 16. *A* Imagen que muestra la ubicación de los electrodos en el corte de hipocampo de cerebro de rata. El electrodo de estimulación se coloca en el tracto perforante y el electrodo de registro en el gyrus dentado. *B* A la izquierda, representación de un fEPSP en estado basal, previo al estímulo. A la derecha, la señal representativa obtenida luego del estímulo, mostrando el incremento respecto a la señal basal que demuestra la potenciación a largo plazo (LTP).

INMUNOHISTOQUÍMICA

Veinticuatro horas después de la administración de Gr, inmediatamente post-entrenamiento, los animales se anestesiaron con hidrato de cloralal 16% (400 mg / kg i.p.) y fueron perfundidos transcardiacamente con 250 ml de solución salina (NaCl al 0,9%) y heparina (200 μ l / l), seguido por 400 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Se extrajeron los cerebros y se mantuvieron durante una noche en PFA y luego se almacenaron a 4 ° C en PB que contiene 30% de sucrosa. Se cortaron secciones coronales de 40 μ m usando un criostato (Leica CM15105) y se recogieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 0,01 M. Se colocaron en una mezcla de 10% H₂O₂ y 10% de metanol hasta que las burbujas de oxígeno cesaron. Las muestras se incubaron en una mezcla de 10% suero de caballo normal (NHS; GIBCO, Auckland, NZ), 0,1% Triton X-100 (Fluka Analytical) en PBS a 0,01 M y 1% de albúmina de suero bovino

(BSA; FEDESA S.A) durante 2 h para bloquear los sitios de unión no específicos. Luego, las secciones flotantes se incubaron durante 48 horas, a 4 ° C, con un anticuerpo policlonal de conejo anti-NMDAR2B (AB1557P, Millipore), diluido 1:500 en PBS que contenía 1% NHS, 1% de BSA, y 0,1% de Triton X-100. Las secciones luego se enjuagaron con PBS a 0,01 M y se incubaron con un anticuerpo secundario universal marcado con biotina (diluido 1: 1000 en 1% NHS-PBS) y complejo avidina-biotina-peroxidasa (diluido 1: 200 en 1% NHS-PBS; Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 2 h cada uno a temperatura ambiente. La marca de la peroxidasa se detectó con clorhidrato de diaminobencidina (Sigma Chemical Co.); la solución fue intensificada con 1% de cloruro de cobalto y 1% sulfato de níquel. Este método produce una reacción nuclear gris oscuro. Por último, las secciones flotantes fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados, secadas al aire libre durante una noche, deshidratados, aclarados con xileno, y se coloca bajo un cubreobjetos con medio de montaje DPX para histología (Fluka Analytical). DPX para histología es una mezcla de distyrene, un plastificante, y xileno, que se utiliza como una resina de montaje sintética que reemplaza xileno-bálsamo de Canadá. DPX seca de forma rápida y preserva la tinción.

CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS INMUNOREACTIVAS-NR2B

Las imágenes que contienen células inmunorreactivas-NR2B (NR2B-IR) se obtuvieron mediante el uso de un sistema computarizado que incluye un microscopio Leica DM 4000 B equipado con una cámara digital Leica DFC unido a un dispositivo de aumento de contraste. Se identificaron las células NR2B-IR dentro de la región dorsal CA1 y DG del hipocampo (correspondiente a las láminas con una distancia de -3,14 a -3,60 mm del Bregma) de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (2009).

En el área CA1, sólo las células piramidales fueron cuantificadas; en DG se contaron las células polimórficas. Se capturaron imágenes bilaterales para cada área del hipocampo, un total de cuatro imágenes por animal para cada grupo. El recuento de NR2B-IR se realizó utilizando el software Image J del Instituto Nacional de Salud (NIH), teniendo en

cuenta un área de 0,09 mm² (correspondiente a un aumento de 400X). El valor obtenido por animal fue el promedio de las células positivas en las cuatro imágenes. El recuento de células NR2B-IR se realizó a ciego en todos los grupos experimentales. Los resultados se expresaron como la media \pm ES. Las NR2B-IR se analizaron mediante ANOVA de una vía. Cuando el ANOVA indicó efectos significativos ($p < 0.05$), se empleó el test post hoc Newman-Keuls.

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN DE SEROTONINA EN HIPOCAMPO POR SUPERFUSIÓN

Drogas y procedimiento de infusión

Gr o fluido cerebrospinal artificial (FCEA) fueron infundidos bilateralmente o adicionados directamente al medio de superfusión.

Superfusión

Para realizar el estudio de liberación de estos neurotransmisores se realizaron experimentos de superfusión dinámica, utilizando cortes sagitales de hipocampo provenientes de los distintos grupos experimentales. Las ratas fueron decapitadas, el cerebro extraído rápidamente trabajando siempre en frío. Se disecó el hipocampo, y se cortó en rebanadas de 240 μ m usando "McIlwain tissue chopper", resuspendidos en tubos de plástico cerrados, conteniendo 5ml de solución buffer Krebs Ringer (KRB) modificado (KRB: 118.6 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2.5 mM Ca²⁺, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM NaHCO₃, 5.5 mM dextrosa y 0.06 mM ácido ascórbico, pH 7.4, saturado con carbógeno, 95% O₂/5% CO₂). Los hipocampos así resuspendidos, fueron incubados a baño María en agitador metabólico Dubnoff a 37°C por 30 minutos, para estabilizar el tejido. Luego de la incubación, se descartó el sobrenadante y se agregó a cada tubo 2 ml de KRB saturado con carbógeno, conteniendo 2 μ l de neurotransmisor tritiado [³H]-5HT, y se incubó nuevamente por 30 minutos, en las mismas condiciones antes detalladas. En esta etapa los

terminales nerviosos específicos se cargan de neurotransmisor tritiado que se incorpora a las vesículas sinápticas. Posteriormente el sobrenadante fue descartado y los cortes transferidos a cámaras especiales de superfusión donde se les realizó un lavado por 30 minutos perfundiendo cada tejido desde la parte superior de la cámara, con KRB a un flujo de 0.7 ml/min con gaseo constante, y recolectando el líquido resultante en la parte inferior para ser desechado. Este lavado se realizó con el objeto de eliminar el neurotransmisor tritiado que no fuera incorporado a los tejidos ('binding' no específico). Cinco minutos antes de comenzar la recolección de las fracciones, los cortes se superfundieron con buffer de trabajo. El experimento de superfusión comenzó con la toma de fracciones recolectando el líquido resultante en la parte inferior de las cámaras, con un colector automático de muestras.

Gr (0.3 or 3 nmol/ μ l) fue adicionada desde el comienzo de la recolección de las fracciones a través de una bomba peristáltica y mantenida hasta el final del experimento a un flujo constantes de 2 μ l/min. Los tejidos utilizados como controles fueron superfundidos adicionando FCEA en lugar de Gr. En las muestras donde Gr o FCEA fueron administrados intrahipocampalmente 24 hs antes del experimento de superfusión, este paso no es realizado.

Se tomaron en total 13 fracciones cada una de las cuales tuvo un volumen de 1.75 ml (correspondientes a 2.5 min de superfusión). Se tomaron cinco fracciones iniciales de 2.5 min cada una, que en conjunto se considera que pertenecen al "periodo de liberación basal" del neurotransmisor tritiado. Durante este periodo los tejidos fueron superfundidos con KRB solo. Posteriormente se colectaron 3 fracciones en las que se superfundió con KCl 28 mM disuelto en KRB para estimular la liberación del contenido de [3 H]5HT de las vesículas sinápticas. En conjunto se considera que estas fracciones pertenecen al periodo de "liberación evocada por K^+ " del neurotransmisor tritiado. Finalmente se colectaron 4 fracciones en las que los cortes de hipocampo fueron superfundidos con el mismo KRB. En conjunto estas fracciones se considera que pertenecen al "periodo de liberación post-estimulación". Cada fracción (1-13) obtenida de la superfusión de cada tejido fue colectada

en tubos plásticos y guardada en heladera a 4°C hasta la posterior medición de la radioactividad en un contador de centelleo líquido (Figura 17). Para poder cuantificar la radioactividad remanente en el tejido, al final de cada experimento de superfusión, los fragmentos de hipocampo se removieron de las cámaras, se homogenizaron en 2 ml de ácido perclórico 0.2 M y se disgregaron por sonicación de manera que se obtuvieron los homogenatos de tejido que fueron también guardados en heladera a 4°C hasta posterior medición de la radioactividad en un contador de centelleo.

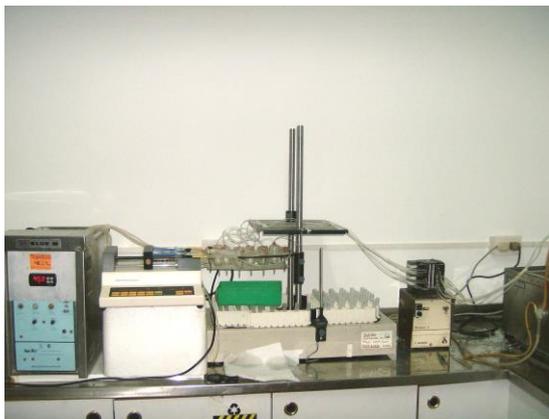


Foto aparato de superfusión

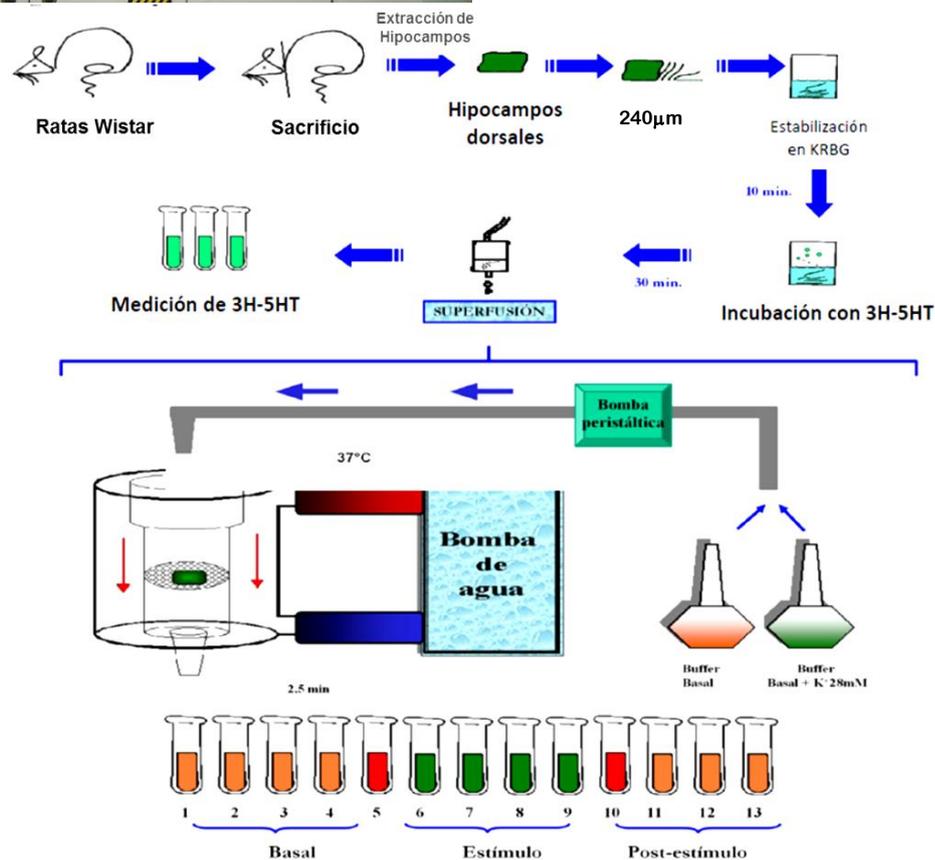


Figura 17. Esquema de superfusión. Representa los pasos seguidos para la superfusión de tejido para medir la liberación del neurotransmisor tritiado.

Cuantificación del neurotransmisor tritiado liberado

Alícuotas de 0,5 ml de cada fracción colectada y del homogenato de los fragmentos de hipocampo, fueron mezcladas con líquido de centelleo para medir la radioactividad en un contador de emisiones beta. Para cada fracción, se calcularon los porcentajes (%) de liberación de neurotransmisor, calculados como la cantidad de radioactividad liberada (en cuentas por minuto–cpm) con respecto a la cantidad de radioactividad (en cpm) remanente en el tejido. Los resultados obtenidos en los diferentes grupos se expresaron como “% de liberación de [³H]-5HT evocada por K⁺” que fueron calculados como la diferencia entre los % de liberación de [³H]-neurotransmisor del “periodo de liberación evocada por K⁺ 28 mM” (promedio de las fracciones N° 6; 7 y 8) y los % de liberación de neurotransmisor del “periodo de liberación basal” (promedio de las fracciones N° 3; 4 y 5, considerado como el 100%). Para el análisis de los perfiles de liberación los resultados graficados fueron los respectivos porcentajes de liberación de neurotransmisor tritiado. Finalmente para las comparaciones entre los valores de liberación basal, estos valores fueron calculados como el promedio de los valores de % de liberación obtenidos en las fracciones N° 3; 4 y 5.

Dado que las variables del SDT y los porcentajes de liberación [³H]-5HT no siguen una distribución normal, ellas se expresaron como mediana (con su rango intercuartil) y fueron analizadas mediante ANOVA de una vía no paramétrico (Prueba de Kruskal-Wallis). Cuando el ANOVA indicó efectos significativos ($p < 0.01$), se empleó el test post hoc de Dunn.



RESULTADOS

Objetivo específico I.

Determinar si el efecto potenciador de Gr sobre la retención de la memoria implica la modulación del proceso de consolidación: ventana temporal de dicho efecto.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que Gr aumenta la retención de la memoria cuando es infundida en el área CA1 de hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento en el SDT y evaluada 24 h después (Carlini et al. 2002, 2004). Además, se observó que Gr podría estar modulando eventos celulares y/o moleculares de señalización implicados en la adquisición y/o consolidación de la memoria, pero no en la evocación de la misma (Carlini VP et al. 2010 a).

En consecuencia, este primer grupo de experimentos fue diseñado con el fin de investigar si el efecto modulador de Gr es actuando específicamente sobre el proceso de consolidación de la memoria. Para tal fin se determinó la posible existencia de una ventana temporal para el efecto potenciador de Gr sobre la memoria evaluada en el SDT.

Diseño experimental: Los animales fueron canulados y 7 días después de la cirugía se entrenaron en el SDT. Posteriormente fueron infundidos bilateralmente en el área CA1 de hipocampo dorsal con salina o Gr (3 nmol/ μ l) a distintos tiempos (0, 15 o 60 min). La retención de la memoria fue evaluada 24 h después (test) (Figura 18).

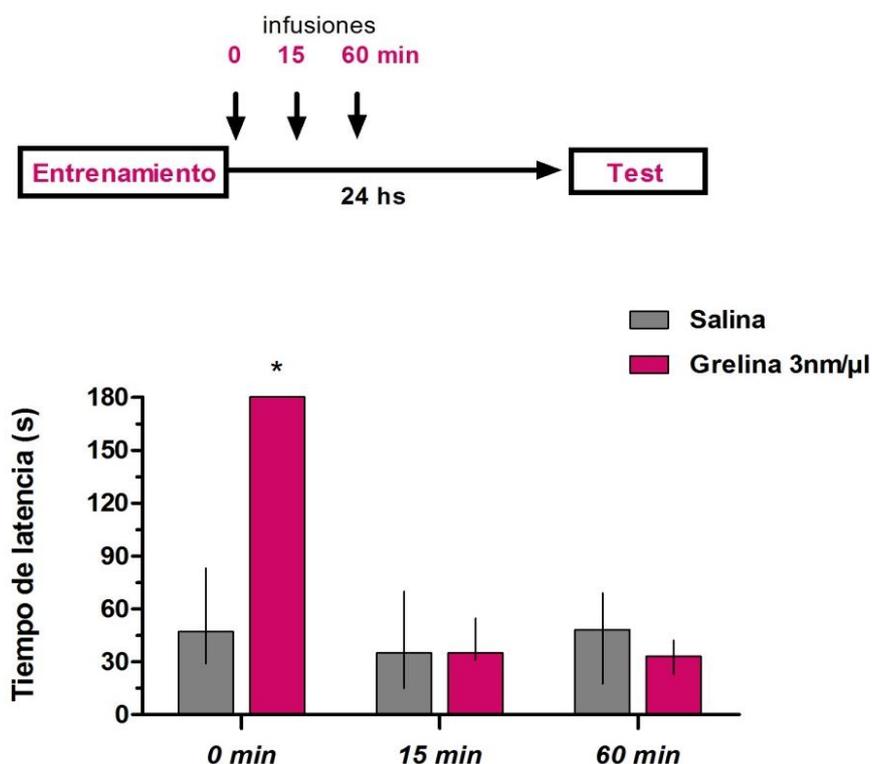


Figura 18. Efecto de Gr administrada a distintos tiempos después del entrenamiento en el SDT. Las ratas fueron entrenadas en el SDT 7 días después de la cirugía. Las mismas fueron infundidas bilateralmente en el área CA1 del hipocampo dorsal con salina o Grelina (3 nmol/μl) a distintos tiempos después del entrenamiento. El tiempo de latencia fue medido 24 h después evaluando la memoria a largo plazo. Los resultados son expresados como mediana del tiempo de latencia con su respectivo rango intercuartil. N=8-10 animales/grupo. * $p < 0.01$, diferencias significativas con el respectivo grupo control (salina).

Los animales que recibieron Gr inmediatamente después del entrenamiento mostraron un incremento en el tiempo de latencia (indicativo de un incremento en la retención de la memoria) cuando se los comparó con los del grupo salina. Ese efecto no se evidenció cuando Gr fue administrada a los 15 ó 60 min post-entrenamiento (Figura 18). El ANOVA de dos vías no paramétrico indicó un efecto significativo del tratamiento (salina o Gr) [$H(1)=13.23$ $p < 0.001$], del tiempo de inyección [$H(1)=8,3$ $p < 0.01$] y de la interacción entre estas variables [$H(1)=6,13$ $p < 0.05$]. El análisis post hoc de Dunn reveló un aumento significativo en el tiempo de latencia de los animales infundidos con Gr inmediatamente post-entrenamiento (0 min) en relación a sus correspondientes controles, mientras que el tiempo de latencia del grupo salina y los grupos Gr infundidos 15 ó 60 min fue similar. Estos resultados indican que Gr podría estar modificando el proceso de consolidación de la

memoria evaluada en el SDT regulando los primeros procesos y/o componentes de la cadena bioquímica de la memoria que se activan minutos después del entrenamiento.

Posteriormente y con el propósito de determinar si la potenciación de la retención de la memoria en el SDT inducida por la administración de Gr post-entrenamiento es debida a un efecto aversivo del péptido “per se” se realizaron los siguientes experimentos..

Diseño experimental: los animales fueron canulados en el área CA1 del hipocampo dorsal. Luego de su recuperación, se dividieron en diferentes grupos: shock y no shock. Los animales del grupo shock fueron sometidos a un entrenamiento en el aparato de SDT e inmediatamente después infundidos con Gr (3 nmol/ μ l) o salina (Grelina shock y control shock). El grupo no shock fue expuesto a la caja de SDT pero no recibió el shock eléctrico; inmediatamente después de descender de la plataforma fueron sacados de la caja de entrenamiento e infundidos con Gr o salina (Grelina no shock y control no shock). La retención de la memoria fue evaluada 24 h después (test) (Figura 19).

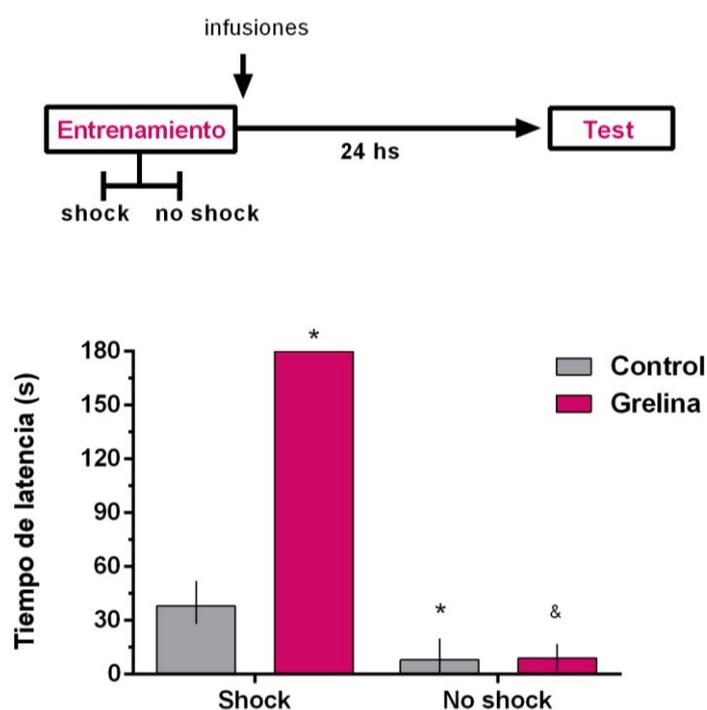


Figura 19. Efecto de Gr sobre la retención de la memoria evaluada en el SDT, con la administración durante el entrenamiento del shock eléctrico (grupos shock) o sin la administración del mismo (grupos no shock). 7 días después de la cirugía los animales fueron

entrenados (grupos shock) en el SDT o solo expuestos a la caja (grupos no shock) e inmediatamente después infundidos bilateralmente en el área CA1 del hipocampo dorsal con salina o Grelina (3 nmol/ μ l). El tiempo de latencia fue medido 24 h después evaluando la memoria a largo plazo. Los resultados son expresados como mediana del tiempo de latencia con su respectivo rango intercuartil. N=8-10 animales/grupo. * $p < 0.01$, diferencias significativas con el respectivo grupo control shock, & diferencias significativas con respecto a Gr shock.

El tiempo de latencia de los animales infundidos con Gr sin la administración del shock eléctrico durante el entrenamiento (grupo Gr no shock) fue similar a los del grupo control no shock (Figura 19). El análisis estadístico (ANOVA de dos vías no paramétrico) reveló un efecto significativo del tratamiento (shock o no shock) [$H_{(1)}=20.60$, $p < 0.001$]. Se realizó un test post hoc de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni, el cual arrojó diferencias significativas entre los grupos control shock y no shock y los grupos Gr shock y no shock. Esto indicaría que no hay expresión de la memoria por la mera administración del péptido. El fenómeno bajo análisis solo se expresa cuando interviene un estímulo aversivo que el animal deba recordar.

Objetivo específico II.

Investigar si los efectos inducidos por el péptido sobre la retención de la memoria y sobre la plasticidad sináptica son dependientes de la activación de su receptor específico (GHS-R1a).

Con el fin de determinar si los efectos de Gr sobre el comportamiento y sobre los parámetros electrofisiológicos observados previamente fueron mediados por la activación directa del receptor de Gr (GHS-R1a) en hipocampo, se administró un antagonista selectivo del GHS-R1a, D-Lys3-GHRP-6, previo a la infusión de Gr, inmediatamente después del entrenamiento en el SDT.

Diseño experimental: 7 días después de la implantación de las cánulas, los animales fueron entrenados en el SDT e inmediatamente después, previo a la infusión de Gr (3 nmol/ μ l) o salina, se administró D-Lys3-GHRP-6 (6 nmol/ μ l) o salina. Todas las

infusiones fueron realizadas bilateralmente en la región CA1 del hipocampo dorsal. La retención de la memoria fue evaluada 24 h después. Luego los animales fueron sacrificados, se disecó el hipocampo y se utilizaron las rebanadas de cada grupo experimental para realizar los procedimientos electrofisiológicos. Los grupos experimentales fueron: salina+salina, salina+Gr, D-Lys3-GHRP-6+salina y D-Lys3-GHRP-6+Gr.

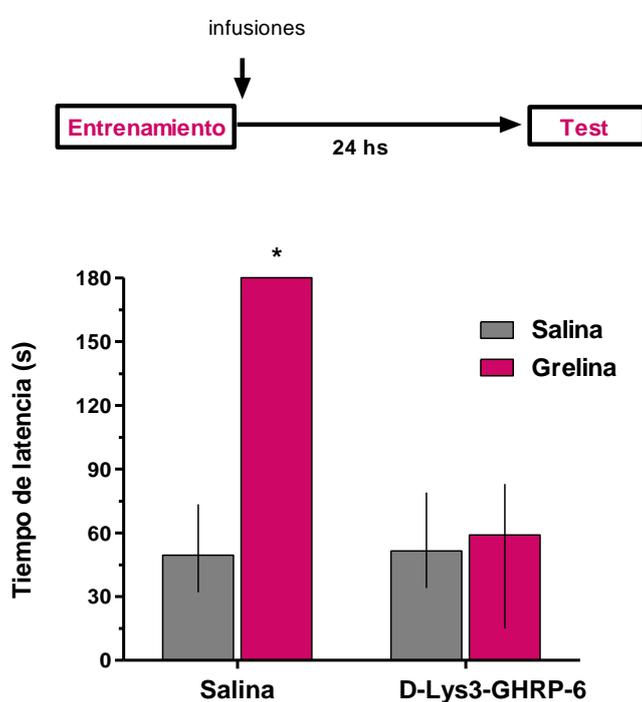


Figura 20. Efecto de la administración del antagonista del GHS-R1a sobre la facilitación de la retención de la memoria inducida por Gr en el SDT. 7 días después de la cirugía los animales fueron entrenados en el SDT y las drogas fueron infundidas inmediatamente después del entrenamiento, en el área CA1 del hipocampo dorsal, D-Lys3-GHRP-6 (6 nmol/ μ l) se infundió 5 minutos antes de Gr (3 nmol/ μ l). El tiempo de latencia fue medido 24 h después. Grupos experimentales: salina+salina, salina+Gr, D-Lys3-GHRP-6+salina y D-Lys3-GHRP-6+Gr. Los resultados son expresados como mediana del tiempo de latencia con su respectivo rango intercuartil. N=8-10 animales/grupo. * $p < 0.01$, diferencias significativas con el respectivo grupo control (salina).

La administración intrahipocampal de Gr inmediatamente después del entrenamiento (grupo salina+Gr) produce un aumento en el tiempo de latencia comparado con el grupo salina+salina en el **paradigma de comportamiento SDT**. Cuando se administró el antagonista D-Lys3-GHRP-6 antes de Gr (grupo D-Lys3-GHRP-6+Gr), no se encontraron diferencias en el tiempo de latencia en comparación con el grupo salina+salina. La administración del antagonista solo (grupo D-Lys3-GHRP-6+salina) no modifica el comportamiento de los animales en relación con el grupo salina+salina (Figura

20). El análisis estadístico (ANOVA de dos vías no paramétrico) del tiempo de latencia durante el test, mostró una interacción significativa entre los grupos salina o D-Lys3-GHRP-6 vs. salina o Gr ($H_{(1)} = 9.1$; $p < 0.01$), revelando que la pre-administración del antagonista selectivo del receptor de Gr, previene la facilitación de la memoria inducida por el péptido.

Con el fin de determinar si la facilitación de la LTP inducida por Gr también depende de la activación de GHS-R1a, se analizaron diferencias en el grado de excitabilidad en las rebanadas de hipocampo de los grupos salina+salina, D-Lys3-GHRP-6+salina, salina+Gr, y D-Lys3-GHRP-6+Gr, observando los valores de frecuencia ("umbral") en Hertz (Hz) necesarios para inducir LTP en DG hipocampal (Figura 21).

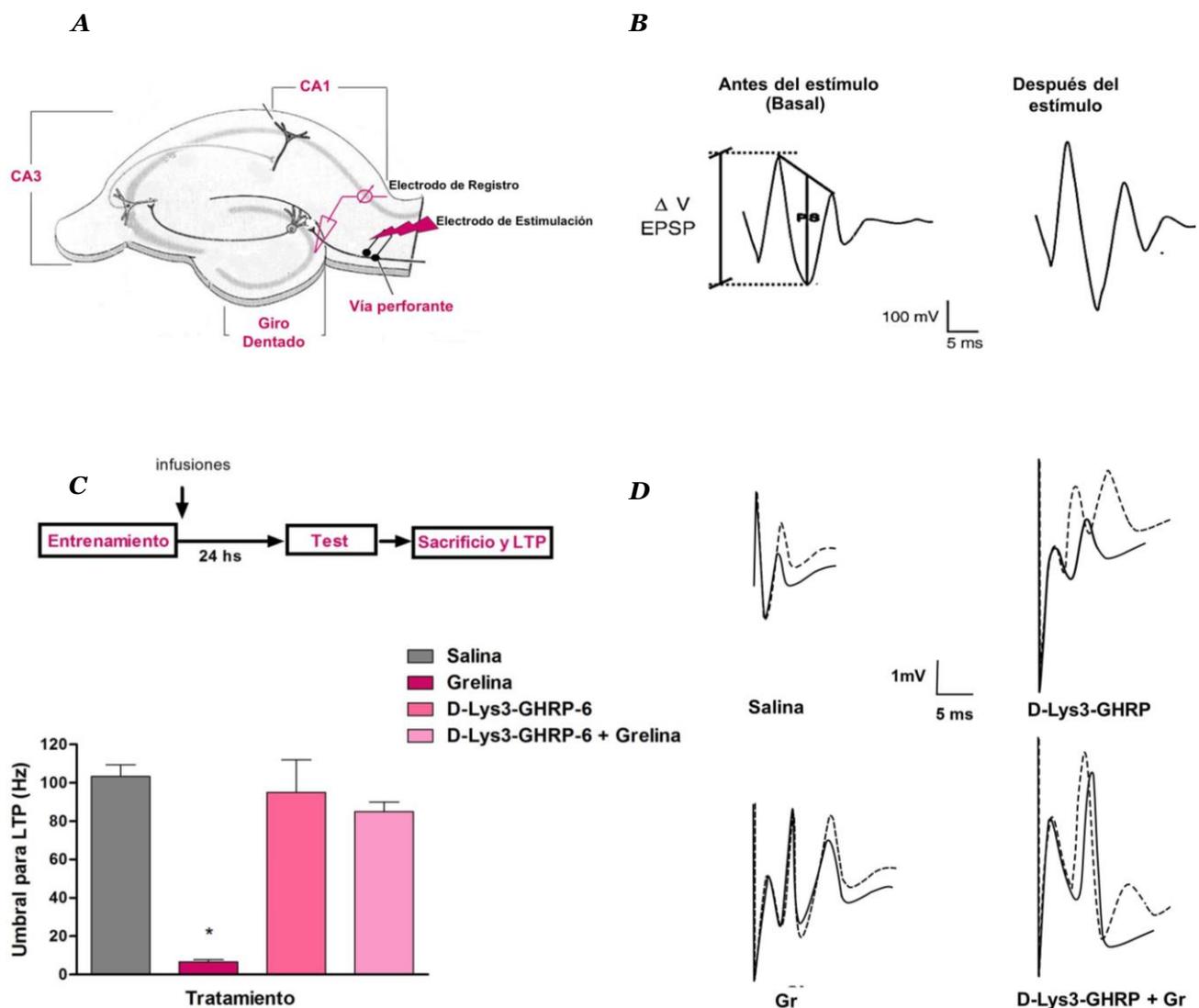


Figura 21. Cambios en parámetros electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo luego de la administración de Gr y del antagonista del GHS-R1a.

A Imagen de un corte de hipocampo que indica la posición de los electrodos de estimulación y de registro. **B** Representación de cómo se toman las medidas en un registro típico de potencial postsináptico excitatorio de campo (EPSP) obtenido en DG del hipocampo, antes y después de la aplicación del tétano. **C** gráfico de barras que muestra el umbral para generar LTP en rebanadas de hipocampo de animales previamente infundidos en CA1 con los diferentes tratamientos y sometidos al SDT 7 días después de la cirugía. * Significativamente diferente de los animales control. Las barras indican medias del umbral (Hz) y las líneas verticales \pm ES. **D** Ejemplos de trazas de EPSP para los diferentes grupos antes (línea continua) y después (línea punteada) del tétano efectivo. N = 5-6 animales / grupo. * $p < 0.05$, significativamente diferente en comparación con el grupo salina.

Como puede verse en estos **experimentos electrofisiológicos** (Figura 21 C), y de acuerdo con los hallazgos anteriores del laboratorio, una reducción significativa en el umbral (Hz) para generar LTP se observó en las rebanadas de hipocampo de animales previamente infundidos con salina+Gr en comparación con aquellos infundidos con salina+salina (salina+Gr= 7 ± 1 Hz vs. salina+salina= 103 ± 6 Hz) sugiriendo que la excitabilidad del tejido es mayor en presencia del péptido. Cuando Gr se infundió en animales pretratados con el antagonista de su receptor, D-Lys3- GHRP-6, no se observó la disminución en el umbral anteriormente descrito, indicando que la mejora en la plasticidad sináptica hipocampal inducida por el péptido es mediada por la activación del GHS-R1a (D-Lys3- GHRP-6+Gr= 85 ± 5 Hz vs. salina+salina= 103 ± 6 Hz). El ANOVA de una vía indicó que el efecto fue significativo para el tratamiento $F(3,17) = 34.9$, $p < 0,05$. El análisis post hoc de Newman Keuls mostró que el antagonista del receptor de Gr no modifica por sí mismo el umbral para generar LTP, ya que los valores de umbral obtenidos a partir del grupo tratado solo con el antagonista selectivo (D-Lys3-GHRP-6+salina) fueron similares a los del grupo de salina+salina (D-Lys3-GHRP-6+salina= 95 ± 13 Hz vs. salina+salina= 103 ± 6 Hz) (Figura 21 C).

En otra serie de experimentos, se estudió en las rebanadas de hipocampo de los diferentes grupos, la respuesta de la estimulación con el paradigma clásico de tetanización (100 Hz). En todos los grupos, la LTP fue generada y no se observaron diferencias en la magnitud de la misma (datos no mostrados).

En los experimentos electrofisiológicos descritos hasta el momento, se utilizaron cortes de hipocampo provenientes de animales que habían sido expuestos al paradigma de comportamiento. Con el fin de descartar el efecto del entrenamiento y visualizar los efectos propios del péptido sobre los parámetros electrofisiológicos, valoramos el umbral para generar LTP en animales tratados con salina o Gr, pero sin ser expuestos al SDT. Los animales fueron infundidos y sacrificados 24 h después para la realización de la LTP, respetando los mismos tiempos utilizados en el entrenamiento en SDT, infusión de drogas, test y sacrificio (Figura 22).

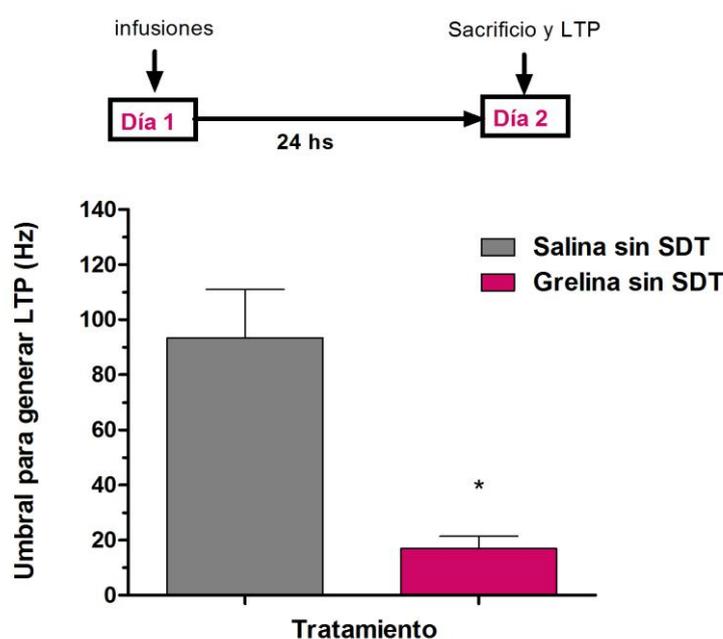


Figura 22. Efecto de Gr sobre el umbral para generar LTP 24 h después de la infusión de la misma en hipocampo, sin la realización del paradigma de comportamiento. Las ratas fueron infundidas en el área CA1 del hipocampo dorsal 7 días después de la cirugía y luego de 24 h fueron sacrificadas para llevar a cabo la electrofisiología. N=4-5 animales/grupo. * $p < 0.05$, diferencias significativas con el respectivo grupo control (salina sin SDT).

El umbral para generar LTP en rebanadas de hipocampo provenientes de animales infundidos 24 h antes con Gr y sin ser expuestos al SDT, es mucho menor en relación a su respectivo grupo control (salina sin SDT) (Figura 22), al igual que ocurre con los animales tratados con Gr y sometidos a un entrenamiento en el SDT (ver Figura 21). (Gr sin SDT = 17 ± 4 Hz; Salina sin SDT = 93 ± 17 Hz). El análisis de t de Student del umbral para generar LTP mostró un efecto significativo del tratamiento ($t = 5.40$, $df = 6$, $p < 0.0017$).

Objetivo específico III.

Determinar el efecto de Gr sobre la liberación de Glutamato endógeno evocado por 4-AP a partir de sinaptosomas hipocampales.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC y está implicado en la transmisión sináptica rápida y en procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad neural.

Con el fin de explorar si los efectos Gr están relacionados con la liberación presináptica de glutamato, se utilizó la liberación del neurotransmisor evocado con 4-AP a partir de sinaptosomas hipocampales.

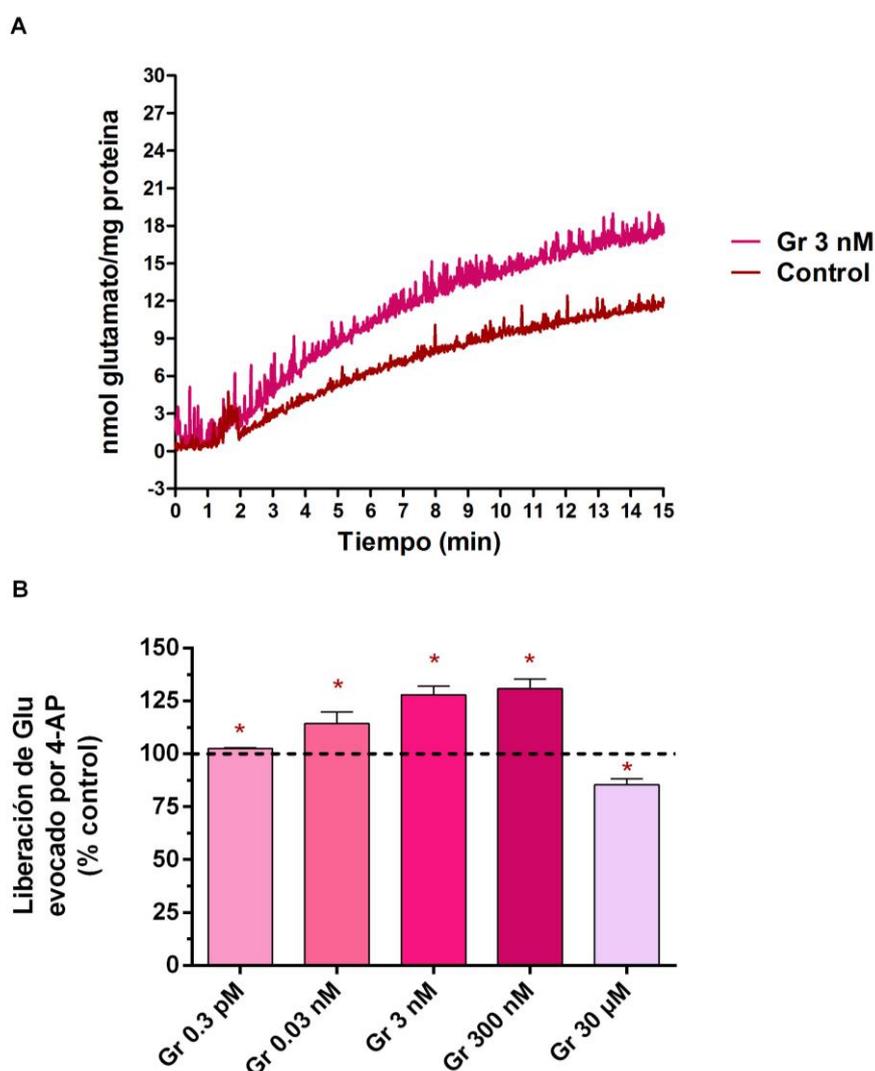


Figura 23. Efecto de Gr sobre la liberación de glutamato endógeno evocado por 4-AP a partir de sinaptosomas de hipocampo. A Registro representativo de la cinética de liberación de glutamato durante 15 min, en condiciones controles (trazado bordó) y con la adición de Gr 3 nM

(trazado fucsia). **B** Las barras representan la liberación de glutamato inducido por Gr con diferentes dosis del péptido. Los resultados son expresados como porcentaje liberado, considerando al control como 100% (línea cortada) y la media \pm ES fue obtenida de 4 experimentos independientes realizados por triplicado. * Valor que es significativamente mayor que la condición control (sin Gr), determinado por ANOVA de una vía, seguido por un análisis post hoc prueba t para comparaciones con un valor teórico (100) ($p < 0.05$).

El registro representativo de la liberación de glutamato durante el período experimental en ausencia (control) o presencia de Gr (3 nM), muestra que el péptido induce un aumento en la liberación a lo largo de todo el período de registro cuando se compara con el grupo control (Figura 23 A).

Gr incrementa la liberación de glutamato, de manera dependiente de la dosis, alcanzando un máximo a concentraciones de 3 y 300 nM (aproximadamente 30% superior con respecto a los valores del control) y produce una disminución significativa en la liberación de glutamato en la dosis más alta (30 μ M) comparado con su respectivo grupo control (Figura 23 B). La administración de diferentes dosis del péptido sobre la liberación de glutamato mostró un aumento significativo a concentraciones de Gr de 0.03, 3, y 300 nM. El porcentaje de liberación de glutamato fue de 114.3 ± 5.5 , 128.0 ± 4.1 y 130.8 ± 4.7 %, respectivamente. El ANOVA de una vía indicó que el efecto fue significativo para el tratamiento $F(4, 12) = 18.15$, $p < 0.0001$.

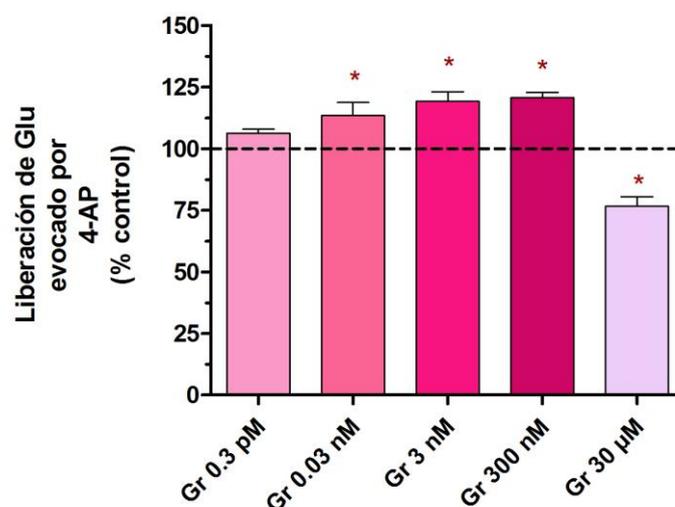


Figura 24. Los resultados representan los valores obtenidos al integrar el área bajo la curva de liberación (entre los 0 y 10 min). El área del control es considerada como 100% (línea cortada). Los valores se expresan como la media \pm ES y fueron obtenidos de 4 experimentos

independientes realizados por triplicado. * Valor que es significativamente mayor que la condición control (sin Gr), determinado por ANOVA de una vía, seguido por un análisis post hoc prueba t para comparaciones con un valor teórico (100) ($p < 0.05$). ($p < 0.05$).

Los mismos resultados fueron procesados también analizando el área bajo la curva (AUC), la cual representa el total de glutamato liberado durante 10 min del experimento, observándose un aumento significativo en la liberación del neurotransmisor para Gr 0.03, 3, y 300 nM (113 ± 5.3 , 119 ± 3.9 y 121 ± 2.3 %, respectivamente) en comparación con el grupo control (100%). El ANOVA de una vía indicó que el efecto fue significativo para el tratamiento [$F(4, 12) = 18.19$, $p < 0.0001$] (Figura 24). Estos valores son similares a los analizados anteriormente (Figura 23 B). Estos resultados sugieren que Gr no solo tiene un papel modulador en la regulación de la transmisión sináptica excitatoria, sino que también apoya la hipótesis de que Gr podría actuar a nivel presináptico.

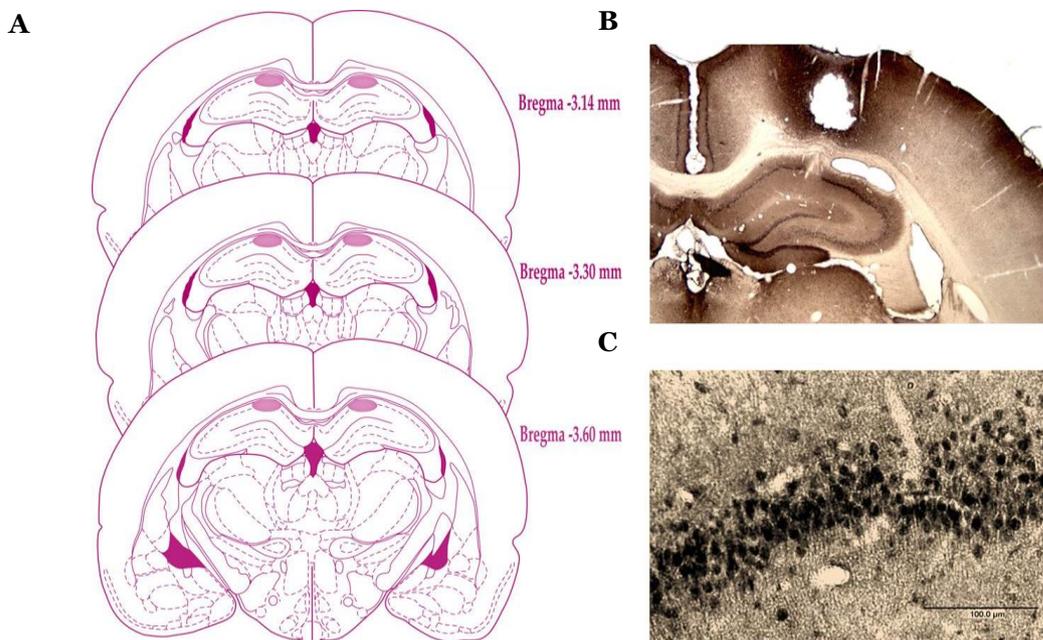
Objetivo específico IV.

Investigar el efecto de la administración del péptido sobre la expresión de la subunidad NR2B de los RNMDA, y sobre los efectos conductuales y electrofisiológicos en animales pretratados con un antagonista de la subunidad NR2B, Ro 25-6981.

A) Impacto de la administración intrahipocampal de Gr en el número de células inmunorreactivas-NR2B.

El glutamato liberado de las terminales presinápticas difunde y se une a sus receptores específicos en la postsinapsis. La subunidad NR2B del RNMDA es crítica para la facilitación de la memoria y la inducción de LTP, en consecuencia, evaluamos por IHQ si la expresión de la subunidad NR2B en hipocampo se modifica después de la administración de Gr.

Diseño experimental: 7 días después de la implantación de cánulas en hipocampo dorsal, los animales fueron entrenados en el SDT, e inmediatamente después recibieron la infusión bilateral en el área CA1 de Gr o salina. 24 h después se sacrificaron, se obtuvieron los cortes coronales de hipocampo dorsal y la inmunorreactividad para en las áreas CA1 y DG fue determinada. Los grupos experimentales fueron: naïve (animales sin cirugía, infusión ni entrenamiento), control (animales entrenados en SDT e infundidos con salina), Gr (animales entrenados en SDT e infundidos con Gr) y control negativo (rebanadas de hipocampo sin el agregado del anticuerpo primario en el procesamiento inmunohistoquímico).



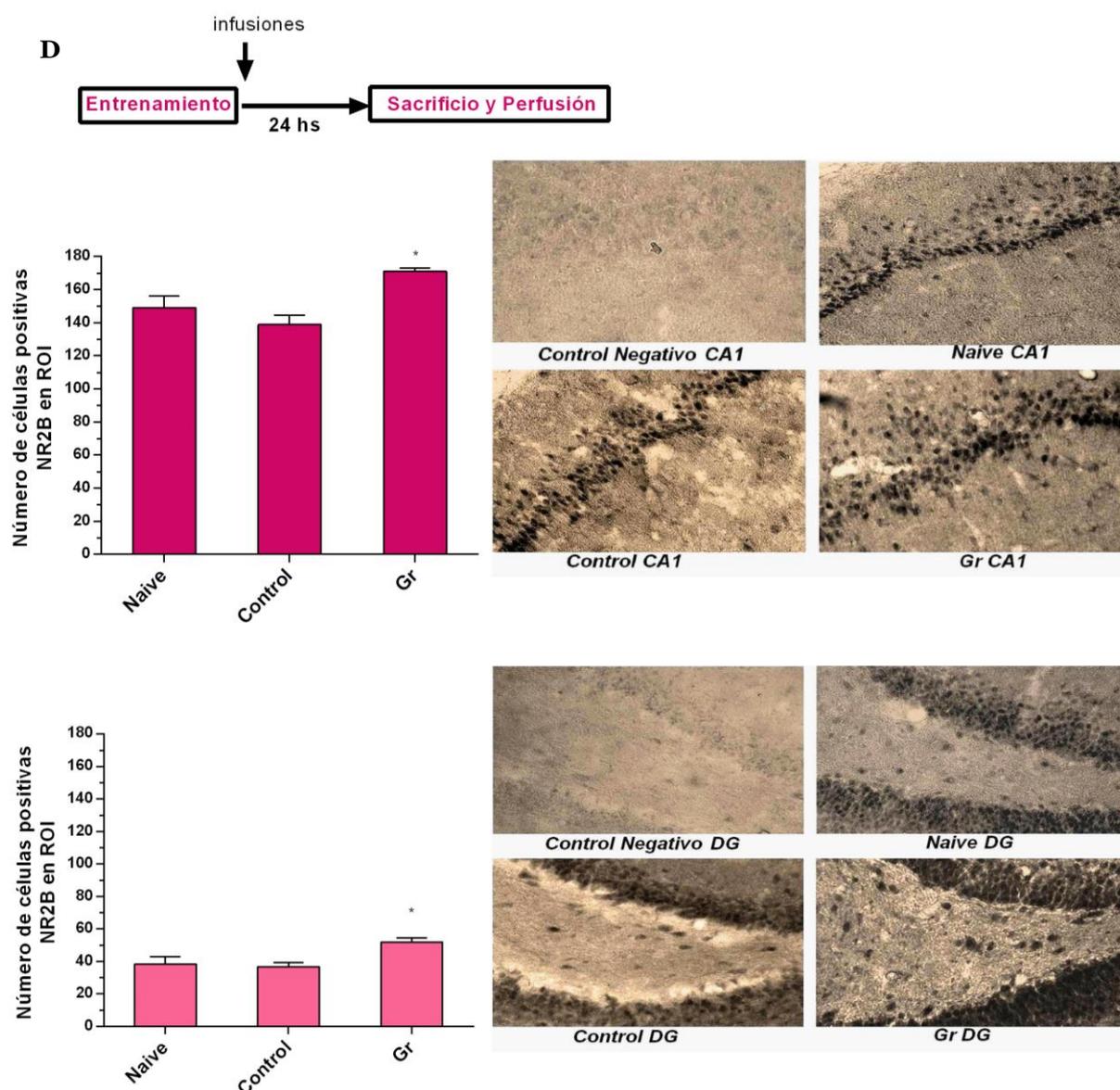


Figura 25. Expresión de las subunidades NR2B después del tratamiento con Gr en hipocampo. **A** Dibujos esquemáticos de las secciones coronales de cerebro de rata (de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson) que indican la localización de la cánula en el área CA1 del hipocampo dorsal. Se indicó en cada dibujo los milímetros por delante del bregma. 7 días después de la cirugía de implantación bilateral de las cánulas, se realizó el entrenamiento en la caja de step down, inmediatamente después Gr o salina fueron infundidas. 24 h post-entrenamiento se sacrificaron los animales, se obtuvieron los cortes de hipocampo, y la inmunorreactividad para células positivas NR2B en las áreas CA1 y DG fue determinada. **B** Fotomicrografía que muestra la posición de la cánula; solamente se representa el lado de la inyección de un hemisferio. **C** Fotomicrografía con escala = 100 micras (μm). **D** Fotomicrografía y gráfico de barras que muestra la inmunorreactividad de células positivas NR2B en rebanadas de animales controles y tratados con Gr en dos áreas diferentes del hipocampo (CA1 y DG). Grupos experimentales: naïve (animales sin cirugía, infusión ni entrenamiento), control (animales entrenados en SDT e infundidos con salina), Gr (animales entrenados en SDT e infundidos con Grelina) y control negativo (rebanadas de hipocampo sin el agregado del anticuerpo primario). $N = 4$ animales / grupo. * $P < 0.05$, diferencias significativas relacionadas con el grupo control.

Los animales entrenados en el SDT e infundidos inmediatamente con Gr (grupo Gr) presentaron un aumento en el número de células NR2B-IR en las áreas hipocampales CA1 y DG en comparación con el grupo control y naïve ($Gr_{CA1} = 171 \pm 2$ vs. $control_{CA1} = 139 \pm 6$ vs $naïve_{CA1} = 149 \pm 7$; $Gr_{DG} = 52 \pm 3$ vs. $control_{DG} = 37 \pm 3$ vs. $naïve_{DG} = 38 \pm 5$) (Figura 25 D). El grupo naïve se incluyó con el fin de descartar el hecho de que los cambios en el número de células NR2B-IR fueran consecuencia del procedimiento experimental (cirugía y/o entrenamiento en el SDT). El ANOVA de una vía indicó un efecto significativo del tratamiento ($F_{CA1 (2, 8)} = 11.6, p < 0.01$; $F_{DG (2, 8)} = 7.4; p < 0.05$). Los resultados del análisis post hoc de Newman Keuls revelaron que existe un aumento significativo en el número de células NR2B-IR en CA1 y DG de animales tratados con Gr comparados con sus respectivos controles, y que no hay diferencias significativas entre los grupos naïve y control en el número de estas células, lo que indica que la expresión basal de la subunidad NR2B no se vio afectada por el procedimiento experimental. Por lo tanto, el aumento del número de células NR2B-IR inducido por Gr podría relacionarse con la facilitación de la memoria observada con su administración.

B) Efectos de la administración intrahipocampal de Gr en animales pretratados con Ro 25-6981.

Con el fin de agregar información funcional sobre la participación de la subunidad NR2B del RNMDA en los efectos de Gr, en esta serie de experimentos se estudiaron los **efectos comportamentales y electrofisiológicos** del péptido (3 nmol/ μ l) en animales previamente infundidos con el antagonista específico de la subunidad NR2B, Ro 25-6981, 5 μ g/ μ l (esta dosis del antagonista fue elegida porque es capaz de inhibir la expresión de la retención de la memoria en el SDT así como la inducción de la LTP).

Diseño experimental: Las ratas fueron entrenadas en el SDT 7 días después de la cirugía de implantación de cánulas. La infusión de las drogas se realizó inmediatamente después del entrenamiento [Ro 25-6981 ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) se infundió 5 minutos antes de Gr ($3 \text{ nmol}/\mu\text{l}$)]; 24 h post-entrenamiento, se evaluó la retención de la memoria en el SDT. Luego los animales fueron sacrificados, se disecó el hipocampo y se utilizaron las rebanadas de cada grupo experimental para realizar los procedimientos electrofisiológicos. Los grupos experimentales fueron: salina+salina, salina+ Gr, Ro 25-6981+salina y Ro 25-6981+Gr.

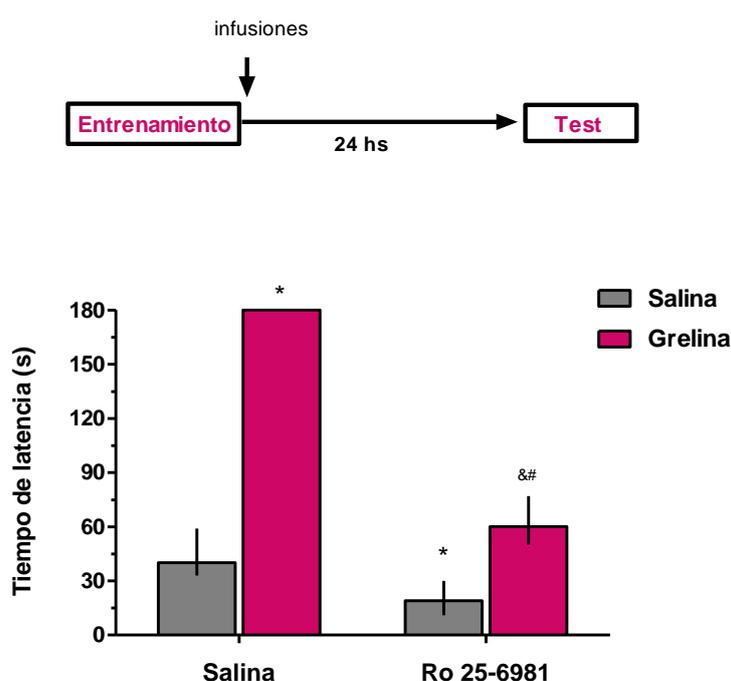


Figura 26. Efecto de Gr y Ro-25-6981 sobre la retención de la memoria en SDT. Las ratas fueron entrenadas en el SDT 7 días después de la cirugía. Gr ($3 \text{ nmol}/\mu\text{l}$) se infundió inmediatamente después del entrenamiento; Ro 25-6981 ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) se infundió 5 minutos antes de Gr. 24 h después, los animales fueron testeados en el SDT y se evaluó la retención de la memoria. Los datos se expresan como la mediana con su rango intercuartil. $N=10-12$ / grupo. * $P < 0.01$, significativamente diferente del vehículo solo (salina); # $P < 0.01$, significativamente diferente de las ratas tratadas con Gr; & $p < 0.01$, significativamente diferente de ratas tratadas con Ro 25-6981.

La retención de la memoria se analizó midiendo el tiempo de latencia en los diferentes grupos experimentales (Figura 26). La infusión de Gr 3 nmol/ μ l (grupo salina+Gr) aumentó el tiempo de latencia en el SDT, tal como se ha descrito anteriormente en la Figura 18. El análisis estadístico (ANOVA de dos vías no paramétrico) del tiempo de latencia durante el test, mostró un efecto significativo del pre-tratamiento (salina o Ro 25-6981) $H_{(1)} = 6,12$; $p < 0.05$ y del tratamiento (salina o Gr) ($H_{(1)} = 19.73$; $p < 0.001$).

El análisis post hoc de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni reveló que la infusión previa del antagonista (grupo Ro 25-6981+salina), disminuyó significativamente el tiempo de latencia en el SDT en relación con el grupo control (salina+salina), lo que indica un deterioro en la retención de la memoria inducida por la administración del antagonista.

Sin embargo, cuando Gr se infundió en animales tratados previamente con Ro 25-6981 (grupo Ro 25-6981+Gr), los valores obtenidos para el tiempo de latencia fueron similares a los del grupo control, y a su vez significativamente más bajos que los del grupo salina+Gr, lo que sugiere que Gr fue capaz de revertir el efecto deletéreo del antagonista sobre la retención de la memoria.

En los **experimentos electrofisiológicos**, se analizaron las posibles diferencias en la inducción de LTP utilizando el paradigma de tetanización clásica o de estimulación supramáxima. Se comparó la amplitud de los EPSP con los EPSP basales expresado como porcentaje (% EPSP), en los diferentes grupos experimentales, después de una estimulación de alta frecuencia (HFS) (Figura 27 A).

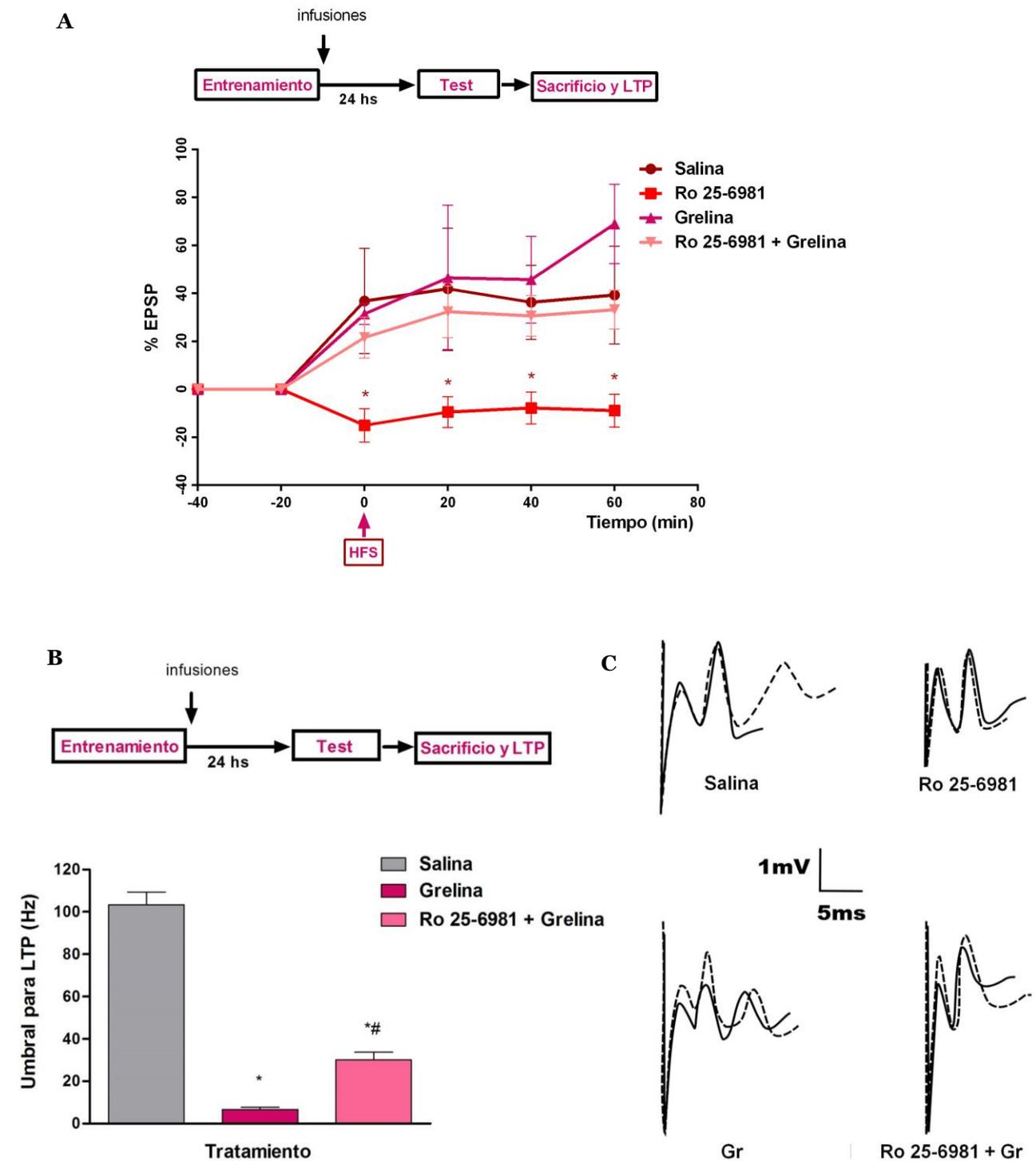


Figura 27. Efectos de Gr y Ro-25-6981 sobre parámetros electrofisiológicos.

A Porcentaje de aumento en los EPSP con respecto al basal en los diferentes tratamientos. * Significativamente diferente del EPSP basal de los grupos salina, Gr y Gr+Ro 25-981. Las barras indican la media del umbral (Hz) y las líneas verticales \pm ES. (HFS: estimulación de alta frecuencia). **B** Gráfico de barra que muestra el umbral para generar LTP en rebanadas de hipocampo de ratas sometidas a los diferentes tratamientos. Las barras representan las medias \pm ES. * Significativamente diferente de los animales del grupo salina. **C** Ejemplos de trazas de EPSP para los diferentes grupos antes (línea continua) y después (línea punteada) del tétano. $N = 6/\text{grupo}$. * $p < 0.05$, significativamente diferente en comparación con el grupo salina.

Las rebanadas provenientes de ratas pre-tratadas con Ro 25-6981+salina presentaron una falla en la inducción de LTP y diferencias significativas respecto a los grupos salina+salina, salina+Gr, y Ro 25-6981+Gr (Figura 27 A) ($F_{(3, 22)} = 4.98$; $p < 0.05$). El test post hoc de Newman Keuls no reveló diferencias en el porcentaje de EPSP entre los grupos salina+salina, salina+Gr y Ro 25-6981+Gr.

Teniendo en cuenta que la generación de LTP fue afectada en el grupo Ro 25-6981+salina y no se observaron diferencias en el grado de potenciación de los EPSP entre los demás grupos, estudiamos posibles diferencias en los valores de frecuencia necesarias para inducir LTP ("umbral") en las rebanadas de hipocampo de los grupos experimentales en los que la LTP fue generada por el protocolo de tetanización clásica (grupos: salina, Grelina y Ro 25-6981+Grelina).

Se observó una reducción significativa en los valores de frecuencia de estimulación para inducir LTP en rebanadas del grupo infundido con salina+Gr comparado con el grupo salina+salina, consistente con nuestros reportes previos. Cuando Gr se infundió en animales pretratados con el antagonista Ro 25-6981 (grupo Ro 25-6981+Gr), este grupo ahora fue capaz de inducir LTP (ya que el grupo Ro 25-6981+salina no genera LTP), mostrando un umbral significativamente mayor que el grupo salina+Gr pero significativamente menor que el grupo salina+salina (Ro 25-6981+Gr = 30.0 ± 3.6 Hz vs. salina+salina = 103.3 ± 6.1 Hz vs. salina+Gr = 6.7 ± 1.0 Hz). ($F_{(2, 15)} = 146.2$, $p < 0.05$; test post hoc de Newman-Keuls, $p < 0.05$). Por lo tanto, Gr no solo mejora la plasticidad sináptica de animales tratados con el antagonista de la subunidad NR2B, los cuales no generaban LTP, sino que también es capaz de inducir en los mismos una mayor excitabilidad hipocampal con respecto a los animales controles.

Objetivo específico V.**Determinar el efecto de Gr sobre la liberación de $^{[3H]}$ 5-HT de rebanadas de hipocampo.**

Ha sido sugerido que el efecto orexigénico del péptido podría ser mediado por la inhibición de la liberación de 5-HT. Además, se ha demostrado que Gr inhibe la liberación de 5-HT en hipotálamo (Brunetti L et al. 2002). Resultados previos en nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento de animales con un inhibidor de la recaptación de 5-HT, como fluoxetina, previo a la administración de Gr (icv o intrahipocampal), inhibe el incremento en la ingesta como así también el efecto facilitador del péptido sobre la retención de la memoria, sugiriendo que estos efectos dependerían de la disponibilidad de 5-HT (Carlini VP et al. 2007). En consecuencia valoramos la liberación de 5-HT a partir de rebanadas de hipocampo de ratas, por la técnica de superfusión.

Diseño experimental: en un primer grupo de experimentos el péptido fue adicionado directamente al medio de superfusión. Los animales fueron separados en dos grupos: control (superfundido con ACSF a un flujo de $2\mu\text{l}/\text{min}$) y Gr (superfundido con ACSF + Gr 0.3 ó $3.0\text{ nmol}/\mu\text{l}$ a un flujo de $2\mu\text{l}/\text{min}$).

En otro grupo de experimentos, los cortes hipocampales utilizados provenían de animales infundidos en el área CA1 de hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento en el SDT y sacrificados 24 h después del mismo. Posteriormente los mismos, fueron preparados para medir la liberación de $^{[3H]}$ 5-HT. Los grupos experimentales fueron: control (ratas que recibieron infusiones intrahipocampales de ACSF, $0.5\ \mu\text{L}$ por sitio, y que fueron sometidas al SDT), control sin SDT (ratas que no fueron entrenadas en el paradigma comportamental) y Grelina (ratas que recibieron infusiones intrahipocampales de Gr $3.0\text{ nmol}/\mu\text{l}$, $0.5\ \mu\text{l}$ por sitio, y que fueron sometidas a SDT).

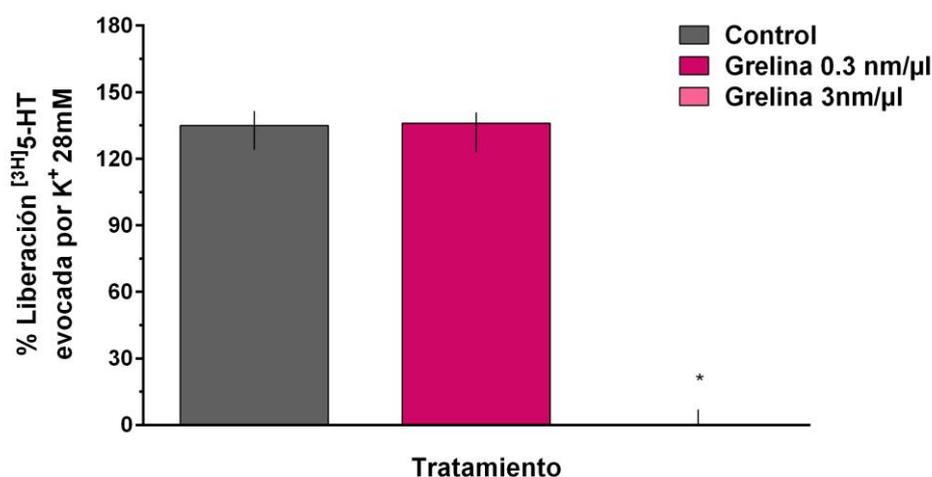


Figura 28. Efecto de diferentes dosis de Gr (0.3 y 3 nmol/μl), adicionada al medio de superfusión, sobre la liberación de [³H] 5-HT a partir de rebanadas de hipocampo. Los resultados se expresan como porcentaje de liberación fraccional (% del basal). Cada barra representa la mediana con su rango intercuartil. N = 5 animales/grupo. * Diferencias significativas en comparación con los animales control (ACSF), $p < 0.01$.

Cuando Gr fue adicionada directamente al medio de superfusión, la dosis más alta inhibió significativamente la liberación de [³H]5-HT en relación con aquellos superfundidos solamente con ACSF (control) (Figura 28). El test de Kruskal-Wallis (ANOVA de una vía no paramétrico) mostró un efecto significativo del tratamiento ($H = 9.48$, $df = 2$, $p < 0.01$). El análisis post hoc de Dunn reveló que los valores obtenidos con una dosis de 0.3 nmol/μl fueron similares a los obtenidos en los animales controles. [ACSF: $135 \pm (124-141)$; Gr 0.3 nmol/μl: $136 \pm (123-141)$ y Gr 3.0 nmol/μl: $0 \pm (0-7)$].

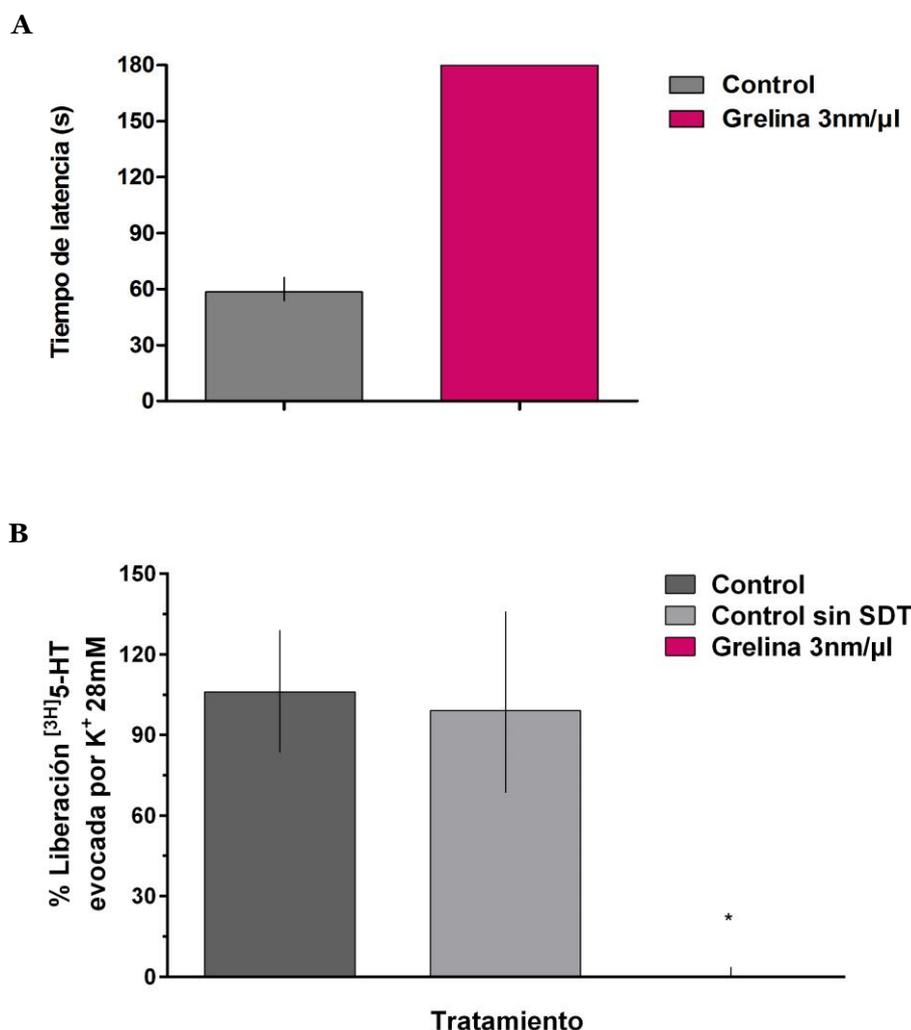


Figura 29. A Efecto de Gr sobre la retención de la memoria a largo plazo en el SDT. Los animales fueron entrenados en el SDT 7 días después de la cirugía. Gr (3 nm/μl) se infundió en el área CA1 del hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento en el SDT. 24 h después los animales fueron testeados para determinar la retención de la memoria. * Diferencias significativas en comparación con animales control (ACSF), $p < 0.01$. **B Efecto de Gr sobre la liberación de ^[3H] 5-HT de rebanadas de hipocampo 24 h después de la administración intrahipocampal del péptido**, tal como se describe arriba. Cada barra representa la mediana con su rango intercuartil. $N = 6$ animales/grupo. * Diferencias significativas en comparación con animales control (ACSF), $p < 0.01$.

Los animales que fueron infundidos en CA1 con Gr (3 nm/μl) inmediatamente después del entrenamiento en el SDT presentaron un incremento significativo en el tiempo de latencia en presencia del péptido en relación con el grupo control, indicando una facilitación en la retención de la memoria [ACSF: $58 \pm (53-62)$; Gr 3.0 nmol/μl: $180 \pm (180-180)$] (Figura 29 A). El test de Kruskal-Wallis determinó que existe un efecto significativo del tratamiento ($H = 4.78$, $df = 1$, $p < 0.01$).

Cuando se analizó la liberación de [^3H] 5-HT a partir de las rebanadas de hipocampo de los animales que fueron entrenados en el SDT se observó que la infusión intrahipocampal de Gr, 24 h antes de los experimentos de superfusión, inhibió significativamente la liberación del neurotransmisor en relación con los animales infundidos solamente con ACSF (control) (Figura 29 B). [ACSF: $106 \pm (83-129)$; Gr 3.0 nmol/ μl : $0 \pm (0-4)$] ($H = 11.62$, $df = 2$, $p < 0.01$).

Con el fin de descartar que los cambios en la liberación del neurotransmisor podrían ser una consecuencia del entrenamiento (shock eléctrico) inducido por el paradigma de comportamiento, la liberación de [^3H] 5-HT se determinó en animales infundidos con ACSF, pero que no recibieron entrenamiento en el aparato de SDT. No se observaron diferencias entre animales entrenados y no entrenados en SDT [Control: $106 \pm (83-129)$; Control sin SDT: $99 \pm (68-136)$] (Figura 29 B).

Un resultado interesante surgió de correlacionar el porcentaje de liberación de [^3H] 5-HT y la retención de la memoria (tiempo de latencia) en el SDT, mediante el análisis de regresión lineal (Figura 30). De acuerdo al índice de correlación de Pearson, se verifica una correlación negativa y significativa de $r = -0.9329$, $p < 0.0001$.

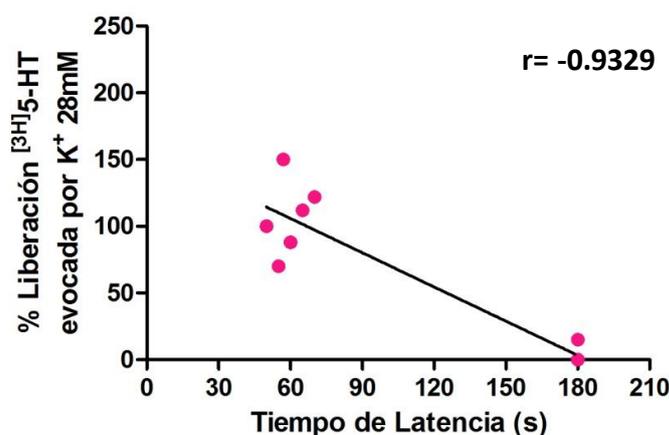


Figura 30. Correlación entre el tiempo de latencia y el % de liberación de [^3H]5-HT en rebanadas de hipocampo obtenidas 24 h después de la administración de Gr. $N = 6$ animales/grupo. El coeficiente de correlación de Pearson fue $r = -0.9329$; $p < 0.0001$.



DISCUSIÓN

Los estudios sobre Gr iniciados después de su descubrimiento, abordaron fundamentalmente su función en el mecanismo de la ingesta a fin de encontrar nuevos diseños terapéuticos para el tratamiento de la obesidad (Dhillon W y Bloom S 2001). En los últimos años, ha sido ampliamente demostrado que moléculas involucradas en el control de la homeostasis energética y de la ingesta tales como Gr, leptina, insulina, NPY, ejercen además efectos cognitivos, en particular en procesos de memoria. (Bennett G et al. 1997; Redrobe J et al. 1999; Sarrar L et al. 2011; Warren M et al. 2012; Ghasemi R et al. 2013).

La incrementada incidencia de las enfermedades neurodegenerativas, que cursan con un deterioro de la función cognitiva, ha llevado a la comunidad científica a explorar los mecanismos que subyacen a los procesos de memoria a fin de diseñar posibles estrategias para superar las disfunciones establecidas en los mismos. En este contexto, en los últimos años, Gr ha emergido como un candidato potencial para el tratamiento paliativo de la pérdida de la memoria. En la actualidad, un gran número de publicaciones surgieron de investigar el posible papel de Gr en enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson (Unger M et al. 2011), Alzheimer (Dos Santos V et al. 2013) y epilepsia (Portelli J et al. 2012). El esclarecimiento de los mecanismos involucrados en los efectos del péptido, permitirá afianzar hallazgos recientes que presentan a Gr como un nuevo e innovador agente terapéutico de potencial uso en las patologías antes mencionadas.

Las bases celulares y moleculares del aprendizaje y la memoria son uno de los objetivos más ambiciosos de la neurociencia actual. Los avances en los últimos años, nos han acercado bastante a la comprensión de los fenómenos involucrados, pero son muchos aun los interrogantes sin responder.

Los estudios realizados en esta tesis se originaron a partir de resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, donde se demostró que la infusión intrahipocampal de Gr facilita la retención de la memoria y esto se correlaciona con una disminución en el umbral para inducir LTP, lo que conduciría a un aumento de la excitabilidad hipocampal. (Carlini et al. 2002, 2004, 2008, 2010). Además, se observó que Gr podría estar modulando eventos

celulares y/o moleculares de señalización implicados en la adquisición y/o consolidación de la memoria, pero no en la evocación de la misma (Carlini VP et al. 2010 a).

La administración de fármacos después del entrenamiento es un método muy utilizado para influir sobre la consolidación de la memoria (para deteriorarla o mejorarla) sin afectar la adquisición o evocación de la misma (Medina JH et al. 2008). La consolidación de la memoria comprende una serie de procesos que se inician luego de la adquisición de un aprendizaje, durante esta etapa la traza mnésica permanece lábil durante un período; estos procesos no tienen una duración definida pero ocurren dentro de una ventana temporal luego del aprendizaje. En el presente trabajo Gr fue administrada después del entrenamiento en el SDT. Los resultados mostraron una facilitación en la consolidación de la memoria inducida por Gr sólo cuando la misma es administrada inmediatamente, y no después de 15 o 60 minutos de la sesión de entrenamiento (Figura 18). Estos hallazgos indican que Gr ejerce sus efectos en una ventana temporal determinada, es decir en los primeros minutos después del aprendizaje, en consecuencia los efectos del péptido podrían estar relacionados con los eventos iniciales de la cascada bioquímica implicada en la consolidación de la memoria. Estos cambios en eventos tempranos también pueden desencadenar eventos tardíos, necesarios para facilitar la memoria a largo plazo y la LTP, ya que los efectos de Gr se observan aún 24 h después de su infusión.

En relación a la LTP, nuestros experimentos indican que Gr facilita por sí misma la excitabilidad hipocampal. Esto se observa en los experimentos en los cuales Gr es infundida en animales que no fueron sometidos al paradigma comportamental y también presentan una disminución en el umbral para generar LTP, con respecto a los tratados con salina (Figura 22). Estos resultados y el hecho de que los receptores GHS-R1a se encuentren altamente expresados en hipocampo, sugieren y refuerzan la idea de que Gr puede ser considerada un importante modulador de la actividad neuronal (Zigman J et al. 2006). Ha sido demostrado recientemente, que los receptores de Gr se encuentran en mayor concentración en la región somática de células piramidales y, en menor medida, en las

regiones apical y basal de dendritas, del área CA1 hipocampal (Cuellar J e Isokawa M 2011). En consecuencia, se analizó si los cambios comportamentales y electrofisiológicos inducidos por el péptido en hipocampo dependen específicamente de la activación de los receptores GHS-R1a. Los resultados mostraron que, tanto la facilitación en la consolidación de la memoria como en la excitabilidad hipocampal inducida por Gr, desaparecen cuando el receptor es bloqueado por su antagonista específico, D-Lys3-GHRP-6, evidenciando una clara participación del receptor GHS-R1a en esta estructura (Figuras 20 y 21).

La cascada molecular de la memoria y la inducción de LTP en hipocampo, ha sido profundamente estudiada por muchos investigadores luego de la realización del SDT, utilizado en el presente trabajo. Esta cascada se inicia con la liberación de glutamato. La unión de este neurotransmisor a los receptores glutamatérgicos inicia a su vez, en la postsinapsis, una serie de eventos bioquímicos intracelulares que finalmente van a producir cambios permanentes en las propiedades sinápticas (Kandel E 2001; Morgado-Bernal I 2011; Wang H et al. 2006). En consecuencia, la modulación de la liberación de glutamato y el funcionamiento de sus receptores tiene un rol crítico en la regulación a nivel molecular y celular de la formación de la memoria.

Nuestros resultados relacionados a los cambios inducidos por Gr en la liberación de glutamato a partir de sinaptosomas hipocampales, mostraron que Gr aumenta la liberación del neurotransmisor, de manera dependiente de la dosis (Figura 23). Los sinaptosomas son estructuras membranosas subcelulares que se forman durante la ruptura leve del tejido cerebral, conservan las características morfológicas y la composición química de la presinapsis (Nicholls DG 2003). Además, ha sido demostrado que los sinaptosomas crudos (fracción P2) purificados a partir de hipocampo de rata, están enriquecidos con el receptor GSH-R1a y que estos receptores se encuentran en las proximidades de las sinapsis glutamatérgicas. Estas evidencias refuerzan la idea de que Gr podría tener un papel en la regulación presináptica de la transmisión sináptica excitatoria hipocampal (Ribeiro LF et al. 2014).

El mecanismo de transducción de los GHS-R1a en varios tejidos implica un aumento de Ca^{+2} en respuesta a su activación. (Isokawa M 2012). Así por ejemplo, Gr aumenta los niveles de $[Ca^{+2}]_i$ en células del ARC (Kohno D et al. 2003, 2008; Yang Y et al. 2011) e hipófisis (Kojima M y Kangawa K 2005). Los mecanismos descritos por los cuales Gr media los efectos sobre la ingesta, implican también, la activación de los GHS-R1a en el núcleo ARC del hipotálamo, modulación de la actividad eléctrica en las células relacionadas con la regulación de la ingesta, tales como la AGRP y aumento de la liberación de glutamato a nivel presináptico (Yang Y et al. 2011). De acuerdo con los resultados antes mencionados en ARC, nuestros resultados parecen indicar que Gr ejerce similares efectos en hipocampo, actuando a nivel presináptico. En consecuencia es razonable pensar que los mecanismos que subyacen los efectos Gr podrían ser similares en diferentes áreas del cerebro.

Tal como se mencionó previamente, la inducción de LTP requiere de la liberación de glutamato, seguido de la activación de receptores tipo AMPA y NMDA a nivel postsináptico. La LTP dependiente de RNMDA es la forma predominante de plasticidad sináptica en el cerebro. Se ha demostrado que el ensamble diferencial de las distintas subunidades que constituyen el RNMDA resulta en diferentes propiedades funcionales del mismo, como consecuencia de diferencias en las subunidades que constituyen el canal iónico. Así por ejemplo, la eliminación genética de las subunidades NR2B del RNMDA, en hipocampo o cerebro anterior, provoca un deterioro en la memoria y alteraciones en la LTP (Sprengel R et al. 1998; Von Engelhardt J et al. 2008). Contrariamente, numerosos modelos animales que presentan niveles elevados de la subunidad NR2B, ya sea por alteración de su síntesis, transporte o degradación, exhiben una mejora en la plasticidad sináptica y la memoria (Lee Y y Silva A 2009; Crair M y Malenka R 1995; Tang Y et al. 1999). Así, se ha demostrado experimentalmente, que la sobreexpresión genética de las subunidades NR2B en hipocampo, amígdala y corteza cerebral de ratones, puede conducir a una mayor LTP hipocámpal y en consecuencia a un mejor desempeño de los animales en diferentes pruebas comportamentales de memoria (Tang Y et al. 1999, 2001; Cao X et al. 2007; Jacobs S y

Tsien J 2012; Cui Y et al. 2011). Resultados similares fueron observados en ratas que sobreexpresan la subunidad NR2B, señalando que los efectos beneficiosos de esta subunidad se conservan en varias especies animales (Wang D et al. 2009).

Además, los niveles de expresión de las subunidades NR2A o NR2B en corteza e hipocampo pueden también modularse de forma dinámica por las experiencias sensoriales (por ejemplo, un medio ambiente enriquecido o interacciones sociales) (Yashiro K and Philpot B 2008.). La presencia de ambas subunidades (NR2A y NR2B) permite el influjo Ca^{2+} para inducir LTP. Sin embargo, el tipo de subunidad predominante que influye más en el influjo de Ca^{2+} , y por lo tanto en la inducción de LTP, depende del protocolo y también de la etapa de desarrollo considerada. La subunidad NR2B parece jugar un papel adicional único debido a su asociación con CaMKII, activando vías de señalización que median la expresión de la LTP. El conocimiento de/l los mecanismo/s de regulación de la subunidad NR2B es importante para lograr mejoras cognitivas (Bibb J et al. 2010; Collingridge G et al. 2013), en consecuencia, en este trabajo se estudiaron si los cambios en las propiedades funcionales inducidos por Gr en hipocampo, podrían relacionarse con el aumento de la expresión de la subunidad NR2B. Nuestros resultados mostraron que Gr aumenta la expresión de la subunidad NR2B en las áreas CA1 y DG, 24 h después de la infusión de la misma en hipocampo (Figura 25), probablemente contribuyendo de esta manera a la facilitación de la memoria en el SDT y a la inducción de la LTP.

Con el objetivo de añadir información funcional relacionada con la participación de la subunidad NR2B en los efectos de Gr, en otra serie de experimentos, se utilizó (tanto en estudios comportamentales como electrofisiológicos) el antagonista específico de la subunidad NR2B, Ro 25-6981, previo a la administración del péptido. El antagonista se usó en una dosis capaz de inhibir la retención de la memoria en el SDT y la inducción de LTP. Cuando Gr se administró en animales pretratados con Ro 25-6981, el deterioro en la memoria inducido por el antagonista fue revertido tal como lo muestra el desempeño de los animales en el SDT (Figura 26), y la excitabilidad hipocampal restaurada, incluso con un umbral menor que el observado en el grupo salina, como lo muestran los resultados de

electrofisiología (Figura 27). El hecho de que la administración de Gr en animales pretratados con Ro 25-6981 mejore el déficit inducido por este antagonista en los parámetros de comportamiento y electrofisiológicos, reafirma la hipótesis de que la facilitación de la memoria inducida por el péptido podría, entre otras causas, correlacionarse con el aumento de la expresión de la subunidad NR2B.

Estos resultados concuerdan con evidencias de otros autores, en diferentes modelos experimentales, que sugieren que la subunidad NR2B estaría relacionada con la mejora de la plasticidad sináptica y la inducción de LTP. Así por ejemplo, ifenprodil, (antagonista de receptores que contienen la subunidad NR2B), bloquea completamente la inducción de LTP en cultivos de hipocampo. A su vez, la sobreexpresión de NR2A o el reemplazo de la subunidad NR2B por NR2A, atenúan la inducción de LTP. (Barria A y Malinow R 2005). Así mismo, la eliminación genética de la subunidad NR2A no altera la inducción de LTP en ratones, sugiriendo que los receptores diméricos NR1/NR2B son suficientes para inducir LTP en hipocampo (Berberich S et al. 2005; Weitlauf C et al. 2005). La mayor influencia sobre la LTP ejercida por la subunidad NR2B podría deberse al hecho de que esta permite un mayor influjo de Ca^{2+} y activa nNOS, induciendo la activación de Ca^{2+}/CaM que activa CaMKII y la producción de NO, responsables de la amplificación de las señales durante el inicio de eventos plásticos. A su vez, CaMKII se une a la subunidad NR2B del RNMDA e induce LTP en sinapsis excitatorias (Bayer K et al. 2006).

Sin embargo, no podemos descartar una posible contribución de otros mecanismos tales como la inducción de la síntesis de novo, la disminución en la degradación de NR2B a través de distintas vías de señalización intracelular o cambios en el tráfico de los receptores desde el citoplasma a sitios sinápticos (Hawasli A et al. 2007).

Por otra parte, ha sido demostrado que PKA fosforila a la subunidad NR2B del RNMDA (Murphy J et al. 2014; Flores-Barrera E et al. 2014) aumentando las corrientes de Ca^{2+} mediadas por el receptor, facilitando de esta manera la inducción de la plasticidad sináptica, al promover la señalización de CREB. Este mecanismo coincide con evidencias en cultivo de células piramidales de CA1, donde la aplicación exógena de Gr regula la

señalización de CREB. Al unirse Gr a su receptor específico GHS-R1a, se activa la vía de señalización AMPc/PKA, dando como resultado un aumento en la función del RNMDA, mediante el incremento del número de subunidades NR1 fosforiladas (Cuellar J e Isokawa M 2011).

En conclusión, el análisis de este grupo de experimentos refuerza la idea de que Gr podría modular los primeros eventos de la consolidación de la memoria en hipocampo, probablemente mediante el aumento de los niveles de $[Ca^{+2}]_i$ inducido por la activación de sus receptores GHS-R1a, el incremento en la liberación de glutamato que, a su vez, activa los RNMDA y estimula diferentes vías moleculares que contribuyen a la facilitación en la retención de la memoria a largo plazo y a la inducción de LTP.

Numerosas evidencias demostraron que 5-HT es un neurotransmisor con efectos significativos sobre el comportamiento, función sináptica, actividad neuronal, etc. (Dieudonné S 2001; Sillar KT et al. 2002). La relación entre la función de 5-HT, aprendizaje y memoria, también ha sido reportada. La acción de 5-HT se cree que es un requisito previo para el control sobre procesos de información cognitiva, y parece tener un papel en procesos de aprendizaje y memoria (Haider S et al. 2012; Bauer EP 2015). Una gran cantidad de hallazgos avalan la participación del sistema serotoninérgico en la plasticidad hipocampal. Así 5-HT y los SSRI han demostrado inhibir la LTP en diversos ensayos fisiológicos (Corradetti R et al. 1992; Kim HS et al. 2006; Kojima T et al. 2003; Mnie-Filali O et al. 2006). Sin embargo, dada la gran diversidad de receptores de 5-HT expresados en todo el SNC, no es sorprendente que la modulación de diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos pueden tener una variedad de efectos sobre la LTP. Así, por ejemplo, la activación de algunos tipos de receptores han demostrado facilitar la LTP y otros atenuarla o inhibirla (Wang RY y Arvanov VL 1998; Corradetti R et al 1992; Passani MB et al. 1994; Mori K et al. 2001).

Muchas son las evidencias que sugieren que los efectos de Gr sobre la ingesta y la retención de la memoria podrían estar relacionados con la disponibilidad de 5-HT. En consecuencia, en un primer grupo de experimentos, Gr fue agregada directamente al medio de superfusión de rebanadas de hipocampo, y en un segundo grupo, el péptido se infundió en CA1 de hipocampo dorsal y los animales fueron sacrificados 24 h después para llevar a cabo la superfusión. En ambos casos, Gr inhibió la liberación de 5-HT (Figuras 28 y 29). Es importante destacar que el efecto de Gr, sobre la liberación del neurotransmisor, fue observado unos pocos minutos después de la adición de la misma en el medio de superfusión, y también 24 h después de su administración intrahipocampal, lo que indica que la disminución de la liberación de 5-HT podría comenzar inmediatamente y persistir al menos durante 24 h. Además, los experimentos mostraron una correlación negativa entre los tiempos de latencia y el porcentaje de 5-HT liberada, ya que bajos niveles de liberación del neurotransmisor, se corresponden con tiempos de latencia mayores, indicativos de una mejor retención de la memoria (Figura 30). En este sentido, existen evidencias que reafirman nuestros resultados en donde experimentos previos de comportamiento, obtenidos en nuestro laboratorio, demostraron que dos agentes inhibidores de la recaptación de 5-HT, tales como Fluoxetina y Clomipramina, administrados antes de la infusión de Gr, inducen un efecto inhibitorio sobre el incremento de la ingesta de alimentos y la retención de memoria provocada por el péptido (Carlini VP et al. 2007).

Además, Brunetti et al. (2002), demostraron que Gr inhibe la liberación de 5-HT de sinaptosomas hipotalámicos de rata. Resultados recientes, obtenidos en cultivo de neuronas hipotalámicas e hipocampales, muestran que los perfiles de expresión de un subtipo de receptor serotoninérgico y el GHS-R1a son coincidentes, y que esta interacción atenúa la señal del receptor de Gr, inhibiendo el efecto orexigénico (Schellekens H et al. 2015). Teniendo en cuenta los resultados antes mencionados, y los resultados actuales, es razonable pensar que la disminución de la liberación de 5-HT observada en hipotálamo representa un mecanismo que podría extenderse a otras estructuras tales como el hipocampo.

Ha sido reportado que existen coincidencias morfológicas y funcionales entre 5-HT y NO. Estudios de inmunohistoquímica, por ejemplo, han proporcionado pruebas sobre la colocalización de la nNOS y 5-HT en proyecciones del NDR en ratas (Simpson KL et al. 2003). Estudios funcionales y farmacológicos han demostrado que el NO puede modular la liberación de 5-HT (Iuras A et al. 2005; Smith JC y Whitton PS 2000; Trabace L et al. 2004).

Trabajos previos demostraron que la administración de Gr en hipocampo (CA1) de ratas, aumenta la actividad de la nNOS, lo que sugiere que Gr induce la activación de la vía nNOS/NO en hipocampo (Carlini VP et al. 2010).

En consecuencia, teniendo en cuenta los presentes resultados en los cuales Gr disminuye la liberación de 5-HT, resultados anteriores donde Gr induce aumento en los niveles de NO hipocampal y el hecho de que Gr aumenta los niveles intracelulares de calcio, nos lleva a plantear la siguiente hipótesis del mecanismo posible: Gr se une a sus receptores GHS-R1a provocando un incremento en los niveles intracelulares de calcio, esto estimula la nNOS aumentando los niveles de NO, el cual sería capaz de inhibir la liberación de 5-HT. Esta hipótesis está de acuerdo con hallazgos que ponen en evidencia que NO juega un importante rol en el control negativo de los niveles intracelulares de 5-HT en hipocampo. Ha sido demostrado el efecto de NO en los niveles de 5-HT hipocampal. Por ejemplo, inhibidores de nNOS (como 7-NI) aumentan los niveles de 5-HT en hipocampo después de su administración tanto local o sistémica; por otro lado, precursores de NO (como L-Arg) producen el efecto opuesto, una disminución en los niveles de 5-HT (Wegener G et al. 2000).

Por otra parte, existen evidencias que demuestran que la activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} disminuye el número de subunidades NR2B sugiriendo que un incremento de 5-HT implicaría una disminución en la eficiencia de los RNMDA (Yuen EY 2005).

Los resultados aquí mostrados, donde Gr incrementa la expresión de las subunidades NR2B e inhibe la liberación de 5-HT, nos llevan a hipotetizar que al disminuir

la liberación del neurotransmisor, disminuiría la activación del receptor 5-HT_{1A} y en consecuencia, esto incrementaría la expresión de las subunidades NR2B.

Nuestra hipótesis acerca de los efectos Gr sobre los eventos de la consolidación de la memoria se representan en la Figura 31, la cual describe el mecanismo por el cual Gr se une a sus receptores a nivel pre- y postsináptico. A nivel presináptico, Gr estimula la liberación de glutamato probablemente mediante el incremento de la liberación de $[Ca^{+2}]_i$. A nivel postsináptico, el glutamato liberado activa los RNMDA, mientras que Gr también ejerce sus efectos directos mediante la activación de sus propios receptores (GHS-R1a). Por lo tanto, la señalización de Gr probablemente comparta algunos de los eventos iniciales de la cascada bioquímica de la memoria y de la LTP, sinergizando el aumento en las $[Ca^{2+}]_i$ y/o la activación de CaMKII que se une a las subunidades NR2B, activando la vía nNOS/NO (Carlini et al. 2010) que incrementa los niveles de NO, contribuyendo de esta manera a la disminución en la liberación de 5-HT (Wegener G et al. 2000). Esta disminución, se traduce en una menor activación del receptor 5-HT_{1A} y en consecuencia, esto incrementaría también la expresión de las subunidades NR2B (Yuen EY 2005), facilitando de esta manera la retención de la memoria a largo plazo y la plasticidad sináptica hipocampal.

Los resultados presentados en este trabajo, abren nuevas perspectivas para la comprensión del mecanismo de la hormona Gr en la modulación de la memoria. Los hallazgos de investigación básica aquí presentados, podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que involucren a los receptores de Gr en patologías neurodegenerativas que cursan con déficit cognitivo tales como Alzheimer, Parkinson y esquizofrenia.

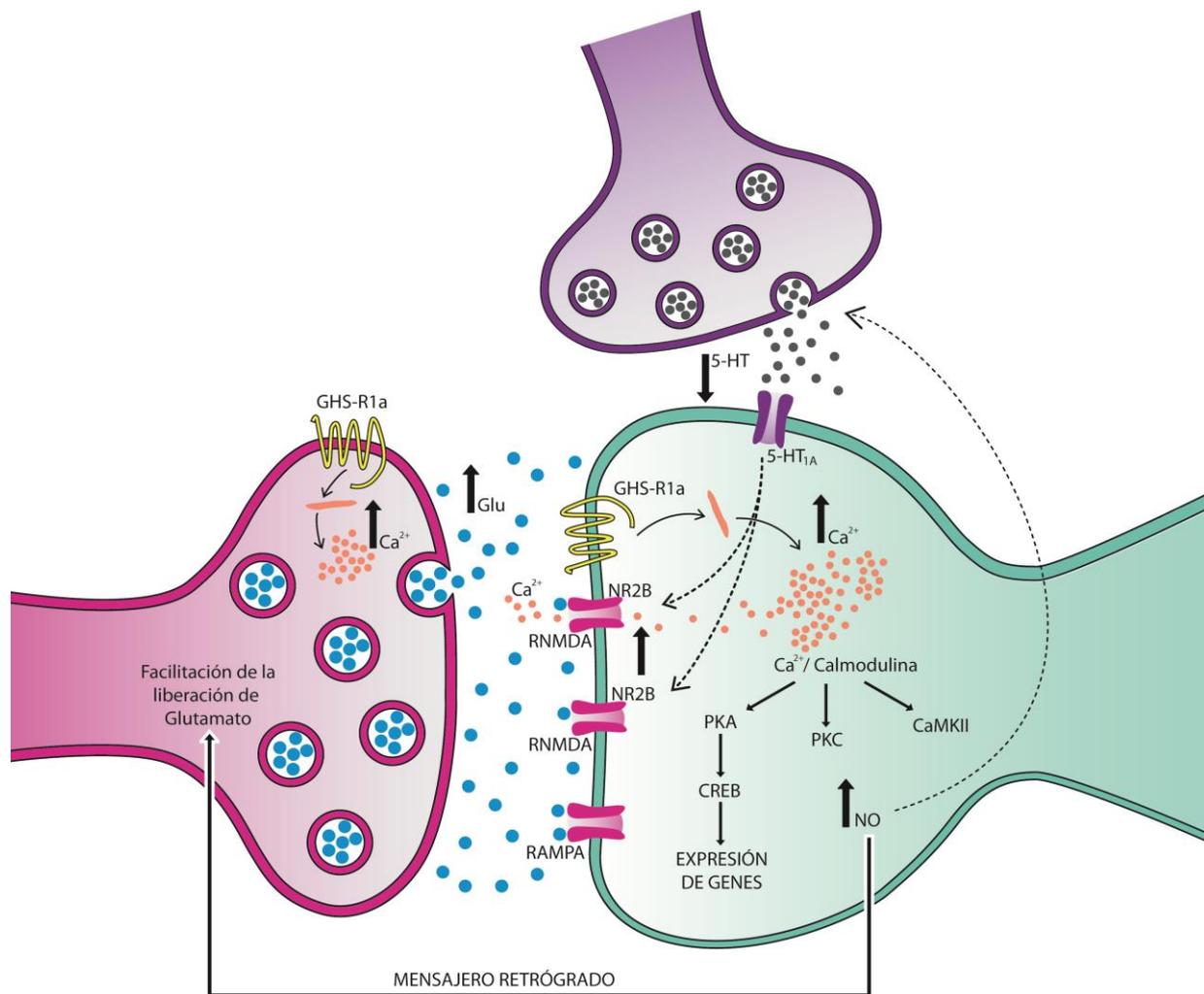


Figura 31. Hipótesis del mecanismo por el cual Gr induce facilitación en la consolidación de la memoria y en la inducción de LTP a nivel hipocampal. A nivel presináptico, Gr se une a su receptor específico GHS-R1a y estimula la liberación de glutamato mediante el incremento de la $[Ca^{+2}]$. A nivel postsináptico, el glutamato liberado activa los RAMPA y RNMDA, mientras que Gr también ejerce sus efectos directos mediante la activación de GHS-R1a, aumentando las $[Ca^{+2}]$; con la consecuente activación de una cascada de señalización de segundos mensajeros, que va a desencadenar la activación de varias quinasas, entre ellas CaMKII, la cual se une a las subunidades NR2B del RNMDA promoviendo un mayor ingreso de Ca^{+2} ; además Gr activa la vía nNOS/NO, incrementando los niveles de NO, el cual actúa como mensajero retrógrado, facilitando la liberación presináptica de glutamato, y por otro lado, también induce una disminución en la liberación de 5-HT. Esta disminución, podría llevar a una menor activación del receptor 5-HT_{1A} (que disminuye la expresión de NR2B), y en consecuencia, esto incrementaría también la expresión de las subunidades NR2B, facilitando de esta manera la retención de la memoria a largo plazo y la plasticidad sináptica hipocampal.

(→ Líneas llenas: vías de activación, ---> líneas punteadas: vías de inhibición, ↑ hacia arriba: aumento, ↓ hacia abajo: disminución; ● azules: glutamato, ● naranjas: calcio y ● grises: serotonina).



BIBLIOGRAFÍA

- Abel T, Kandel E. (1998). Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res Brain Res Rev.* 26(2-3):360-78. Review.
- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88(5):615-26.
- Ahmed T, Frey JU. (2005). Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro. *Neuropharmacology* 49:477-92.
- Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K. (2004). Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol.* 150(4):447-55.
- Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2002). Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 143:3341-50.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4753-58.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujiyama M, Nijina A, Fujino MA, Kasuga M. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120:337-45.
- Atcha Z, Chen WS, Ong AB, Wong FK, Neo A, Browne ER, Witherington J, Pemberton DJ. (2009). Cognitive enhancing effects of ghrelin receptor agonists. *Psychopharmacology* 206(3):415-27.
- Bagnasco M, Kalra PS, Kalra SP. (2002). Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats. *Endocrinology* 143:726-29.
- Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML. (2002). Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302:822-27.
- Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. (2002). Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 67:1768-76.

- Barria A, Malinow R. (2005). NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48(2):289-301.
- Bartus K, Pigott B, Garthwaite. (2013). Cellular targets of nitric oxide in the hippocampus. *PLoS One* 8(2):e57292.
- Bauer EP. (2015). Serotonin in fear conditioning processes. *Behav Brain Res.* 277:68-77.
- Bayer KU, LeBel E, McDonald GL, O'Leary H, Schulman H, and De Koninck P. (2006). Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *The Journal of Neuroscience* 26(4):1164-74.
- Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A. (2002). Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats. *Biochem Biophys Res Commun* 292(4):1031-35.
- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV. (2000). Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem.* 16;43(23):4370-6.
- Bellone S, Rapa A, Vivenza D, Castellino N, Petri A, Bellone J, Me E, Broglio F, Prodam F, Ghigo E, Bona G. (2002). Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest* 25:13-15.
- Bennett GW, Ballard TM, Watson CD, Fone KC. (1997). Effect of neuropeptides on cognitive function. *Exp Gerontol* 32:451-69.
- Bennett PA, Thomas GB, Howard AD, Feighner SD, van der Ploeg LH, Smith RG, Robinson IC. (1997). Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 138:4552-7.
- Berberich S, Punnakkal P, Jensen V, Pawlak V, Seeburg PH, Hvalby Ø, Köhr G. (2005). Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* 25(29):6907-10.
- Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMPdependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(13):7041-6.
- Berrout L, and Isokawa M. (2012). Ghrelin promotes reorganization of dendritic spines in cultured rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.*16;516(2):280-4.
- Bi GQ, Poo MM. (1998). Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci.* 18(24):10464-72.

- Bibb JA, Mayford MR, Tsien JZ, and Alberini CM. (2010). Cognition enhancement strategies. *J. Neurosci.* 30:14987–92.
- Bliss TV, Collingridge GL. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-9.
- Bliss TV, Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232(2):331-56.
- Boccia MM, Blake MG, Baratti CM, McGaugh JL. (2009). Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem.* 91(1):93-7.
- Boccia MM, Blake MG, Krawczyk MC, Baratti C M. (2010). Hippocampal $\alpha 7$ -nicotinic receptors modulate memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Neuroscience.* 171(2):531-43.
- Bowers CY. (1998). Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol Life Sci.* 54:1316-29.
- Bowers CY. (2001). Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:1464-69.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347(6295):768-70.
- Bredt DS, Snyder SH. (1990). Isolation of nitric oxide synthase: a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:682-85.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84(5):757-67.
- Broglio F, Gottero C, Arvat E, Ghigo E. (2003). Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Horm Res.* 59(3):109-17. Review.
- Brunetti L, Recinella L, Orlando G, Michelotto B, Di Nisio C, Vacca M. (2002). Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. *Eur J Pharmacol.* 454: 189–92.
- Buhot MC, Martin S, Segu L. 2000. Role of serotonin in memory impairment. *Ann. Med.* 32: 210–21.
- Bures J, Buresová C, Huston JP. (1983). Techniques and basic experiments for the study of brain and behaviour. Amsterdam Elsevier 148-61.

- Burgard EC, Cote TE, Sarvey JM. (1993). Muscarinic depression of synaptic transmission and blockade of norepinephrine-induced long-lasting potentiation in the dentate gyrus. *Neurosci* 54:377-89.
- Burwell RD, Amaral DG. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 398(2):179-205.
- Cabral A, De Francesco PN, Perello M. (2015). Brain circuits mediating the orexigenic action of peripheral ghrelin: narrow gates for a vast kingdom. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 6:44. doi: 10.3389/fendo.2015.00044
- Cai H, Cong WN, Daimon CM, Wang R, Tschöp MH, Sévigny J, Martin B, Maudsley S. (2013). Altered lipid and salt taste responsivity in ghrelin and GOAT null mice. *PLoS One* 8:e76553.
- Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS. (2004). Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1319-24.
- Camiña JP, Carreira MC, El Messari S, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF. (2004). Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 145:930-40.
- Camiña JP. (2006). Cell biology of the ghrelin receptor. *J Neuroendocrinol* 18:65-76.
- Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, Garcia-Caballero T, Goldring MB, Casanueva FF, Gomez-Reino JJ, Dieguez C. (2005). The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology* 146:1285-92.
- Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C. (2003). Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144:1594-1602.
- Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B, Tsien JZ. (2007). Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci*. 25(6):1815-22.
- Carlini VP, Gaydou RC, Schiöth HB, de Barioglio SR. (2007). Selective serotonin reuptake inhibitor (fluoxetine) decreases the effects of ghrelin on memory retention and food intake. *Regul Pept* 140(1-2):65-73.
- Carlini VP, Ghersi M, Schiöth HB, de Barioglio SR. (2010 a). Ghrelin and memory: differential effects on acquisition and retrieval. *Peptides* 31(6):1190-3.
- Carlini VP, Martini AC, Schiöth HB, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, de Barioglio SR. (2008). Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. *Neuroscience*. 153(4):929-34

- Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragnolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR. (2002). Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 299(5):739-43.
- Carlini VP, Perez MF, Salde E, Schiöth HB, Ramirez OA, de Barioglio SR. (2010). Ghrelin induced memory facilitation implicates nitric oxide synthase activation and decrease in the threshold to promote LTP in hippocampal dentate gyrus. *Physiology & Behavior* 101:117-123
- Carlini VP, Varas MM, Cragnolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR. (2004). Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun.* 313(3):635-41.
- Casanueva FF, Dieguez C. (2002). Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord.* 3:325-38.
- Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G. (2001). Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1738-45.
- Chan CB, Cheng CH. (2004). Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. *Mol. Cell Endocrinol.* 214:81-95
- Chazot PL, Coleman SK, Cik M, Stephenson FA. (1994). Molecular characterization of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in mammalian cells yields evidence for the coexistence of three subunit types within a discrete receptor molecule. *J Biol Chem* 269:24403-9.
- Chen L, Xing T, Wang M, Miao Y, Tang M, Chen J,... Ruan DY. (2011). Local infusion of ghrelin enhanced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory through activation of phosphoinositide 3-kinase in the dentate gyrus of adult rats. *European Journal of Neuroscience* 33(2):266-75.
- Chuang JC, Perello M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Savitt JM, Lutter M, Zigman JM. (2011). Ghrelin mediates stress-induced food-reward behavior in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 121:2684-92.
- Clayton NS, Bussey TJ, Dickinson A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nat Rev Neurosci* 4(8):685-91.
- Clayton NS, Dickinson A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395(6699):272-74.

- Collingridge GL, Volianskis A, Bannister N, France G, Hanna L, Mercier M, Tidball P, Fang G, Irvine MW, Costa BM. (2013). The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology* 64:13–26.
- Corradetti R, Ballerini L, Pugliese AM, Pepeu G. (1992). Serotonin blocks the long-term potentiation induced by primed burst stimulation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience* 46(3):511-8.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37:649-61.
- Crair MC, and Malenka RC. (1995). A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375:325–28
- Cuellar JN, Isokawa M. (2011). Ghrelin-induced activation of cAMP signal transduction and its negative regulation by endocannabinoids in the hippocampus. *Neuropharmacology* 60(6):842-51.
- Cui Y, Jin J, Zhang X, Xu H, Yang L, Du D, Zeng Q, Tsien JZ, Yu H, Cao X. (2011). Forebrain NR2B overexpression facilitating the prefrontal cortex long-term potentiation and enhancing working memory function in mice. *PLoS One* 6(5):e20312.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50:1714-19.
- Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346:1623-30.
- Currie PJ, John CS, Nicholson ML, Chapman CD, Loera KE. (2010). Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine inhibits the effects of ghrelin on eating and energy substrate utilization. *Pharmacol Biochem Behav.* 97(1):152-5.
- Damian M, Marie J, Leyris JP, Fehrentz JA, Verdié P, Martinez J, Banères JL, Mary S. (2012). High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J Biol Chem.* 287(6):3630-41.
- Date Y, M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M.S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255–61.

- Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S. (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51:124-29.
- De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C. (2003). Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidic hormone. *Med Sci Monit.* 9:217-24.
- De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C. (2004). Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: Identification of the cleavage sites. *Endocrinology*, 145(11), 4997–5005.
- De Vriese C, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C. (2007). Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology*, 148(5) 2355–62.
- Debiec J, LeDoux JE, Nader K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36(3):527-38.
- Delhanty PJ, van der Eerden BC, van der Velde M, Gauna C, Pols HA, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JP. (2006). Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol* 188:37-47.
- Delhanty PJ, van Koetsveld PM, Gauna C, van de Zande B, Vitale G, Hofland LJ, van der Lely AJ. (2007). Ghrelin and its unacylated isoform stimulate the growth of adrenocortical tumor cells via an anti-apoptotic pathway. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293(1):E302-9.
- Dhillon WS, Bloom SR. (2001). Hypothalamic peptides as drug targets for obesity. *Curr Opin Pharmacol* 1:651–55.
- Diano S, Farr S, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, ...Horvath TL. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature Neuroscience* 9(3):381–8.
- Dieudonné S. (2001). Serotonergic neuromodulation in the cerebellar cortex: cellular, synaptic, and molecular basis. *Neuroscientist.* 7(3):207-19. Review.
- Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW Jr, Taub DD. (2004). Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 114:57-66.
- Domjan M. *Principios de aprendizaje y conducta. Sexta edición.* (2010). ISBN-13: 978-607-481-327-2/ ISBN-10: 607-481-327-2.
- Dornonville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R. (2001). A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept*, 99:141-150.

- Dos Santos VV, Rodrigues AL, De Lima TC, de Barioglio SR, Raisman-Vozari R, Prediger RD. (2013). Ghrelin as a neuroprotective and palliative agent in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 19(38):6773-90.
- Dudai Y, Eisenberg M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44(1):93-100.
- Dudai Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol.* 12(2):211-6.
- Dumas TC. (2005). Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog Neurobiol* 76:189-211.
- Dunkley PR, Heath JW, Harrison SM, Jarvie PE, Glenfield PJ, and Rostas JA. (1988). A Rapid Method for Isolation of Synaptosomes on Percoll Gradients. *Brain Res* 441(1-2): 59-71.
- Erşahın M, Toklu HZ, Erzik C, Akakin D, Tetik S, Sener G, Yeğen BC. (2011). Ghrelin alleviates spinal cord injury in rats via its anti-inflammatory effects. *Turk Neurosurg* 21(4):599-605.
- Feijo FdM, Bertoluci MC, Reis C. (2011). Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 57:74-7.
- Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Traini S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S, Arnoletti E, Ghè C, Fubini A, Surico N, Sinigaglia F, Ponzetto C, Muccioli G, Crepaldi T, Graziani A. (2007). Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Molecular Biology of the Cell* 18:986-94.
- Flores J, Armijo A, Mediavilla A, *Farmacología Humana 4ed.* (2004). Ed. Masson (pág. 441).
- Flores-Barrera E, Thomases DR, Heng LJ, Cass DK, Caballero A, Tseng KY. (2014). Late adolescent expression of GluN2B transmission in the prefrontal cortex is input-specific and requires postsynaptic protein kinase A and D1 dopamine receptor signaling. *Biol Psychiatry.* 75(6):508-16.
- Fontan-Lozano A, Saez-Cassanelli JL, Inda MC, de los Santos-Arteaga M, Sierra-Dominguez A, Lopez-Lluch G, Delgado-Garcia JM, Carrion AM. (2007). Caloric Restriction Increases Learning Consolidation and Facilitates Synaptic Plasticity through Mechanisms Dependent on NR2B Subunits of the NMDA Receptor. *Journal of Neuroscience* 27(38):10185-95.
- Frankland PW, Ding HK, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ. (2006). Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem.* 13:451-57.
- Furness JB, Hunne B, Matsuda N, Yin L, Russo D, Kato I, Fujimiya M, Patterson M, McLeod J, Andrews ZB, Bron R. (2011). Investigation of the presence of ghrelin in the central nervous system of the rat and mouse. *Neuroscience.* 193:1-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.07.063.

- Gahete MD, Córdoba-Chacón J, Kineman RD, Luque RM, Castaño JP. (2011). Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: implications in Alzheimer's disease. *Peptides* 32(11):2225–8.
- Gahete MD, Rubio A, Córdoba-Chacón J, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Avila J, Luque RM, Castaño JP. (2010). Expression of the ghrelin and neurotensin systems is altered in the temporal lobe of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 22(3):819-28. doi: 10.3233/JAD-2010-100873.
- Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. (2004). Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:400-09.
- Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. (2003). Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 88:879-87.
- Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. (2013). Insulin in the Brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol* 47:145–71.
- Goebel DJ, Poosch MS. (1999). NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res* 69:164-70.
- Gold PE. (1995). Role of glucose in regulating the brain and cognition. *Am J Clin Nutr* 61:987-95. Review.
- Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghe C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E, Muccioli G. (2007). Acylated and Unacylated Ghrelin Promote Proliferation and Inhibit Apoptosis of Pancreatic β -Cells and Human Islets: Involvement of 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate/Protein Kinase A, Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, and Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/Akt Signaling. *Endocrinology* 148:512-29.
- Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F. (2001). Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142:788-94.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 48:23–9.
- Haider S, Khaliq S, Tabassum S, Haleem DJ. (2012). Role of somatodendritic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors on learning and memory functions in rats. *Neurochem Res.* 37(10):2161-6.

- Hampton R R. (2001). Rhesus monkeys know when they remember. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(9):5359-62.
- Hansson C, Alvarez-Crespo M, Taube M, Skibicka KP, Schmidt L, Karlsson-Lindahl L, Egecioglu E, Nissbrandt H, Dickson SL. (2014). Influence of ghrelin on the central serotonergic signaling system in mice. *Neuropharmacology*. 79:498-505.
- Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. (2001). GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4284-91.
- Hawasli AH, Benavides DR, Nguyen C, Kansy JW, Hayashi K, Chambon P, Greengard P, Powell CM, Cooper DC, Bibb JA. (2007). Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nat Neurosci*. 10(7):880-6.
- Hawkins RD, Son H, Arancio O. (1998). Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 118:155-172.
- Henson MA, Roberts AC, Perez-Otano I, Philpot BD. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol*. 91(1):23-37.
- Hernandez PJ, Abel T. (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. *Neurobiology of Learning and Memory* 89:293-311.
- Hewson AK, Dickson SL. (2000). Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12:1047-49.
- Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M. (2001). Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142:4163-69.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. (2000). Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*. 275(29):21995-2000.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*. 278:64-70.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-7.

- Isokawa M. (2012). Cellular signal mechanisms of reward-related plasticity in the hippocampus. *Neural Plast.* 2012:945373.
- Iuras A, Telles MM, Bertoncini CR, Ko GM, de Andrade IS, Silveira VL, Ribeiro EB. 2005. Central administration of a nitric oxide precursor abolishes both the hypothalamic serotonin release and the hypophagia induced by interleukin-1beta in obese Zucker rats. *Regul Pept.* 124(1-3):145-50.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato J, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* 29(9):496-505.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, da Silva WC, Bonini J, Medina JH, Cammarota M. (2008). The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotox Res.* 14(2-3):273-94. Review.
- Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol.* 58:16-26.
- Izquierdo I, McGaugh JL. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol.* (7-8):517-34. Review.
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res.* 103(1):1-11.
- Izquierdo I, Medina JH. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem* 63:19-32. Review.
- Izquierdo I, Medina JH. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68(3): 285-316.
- Jacobs SA and Tsien JZ. (2012). Genetic overexpression of NR2B subunit enhances social recognition memory for different strains and species. *PLoS One* 7:36387-28.
- Jiang H, Li LJ, Wang J, Xie JX. (2008). Ghrelin antagonizes MPTP-induced neurotoxicity to the dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. *Exp Neurol.* 212(2):532-7.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20:68-100.
- Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2004). Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 145:4144-53.

- Kandel ER. (2001). *The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses*. *Science* 294(5544):1030-8.
- Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG. (2012). *Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism*. *Neuron* 73:317-32.
- Kheradmand A, Alirezaei M, Birjandi M. (2010). *Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary*. *Regul Pept.* 162(1-3):84-9.
- Kim HS, Jang HJ, Cho KH, Hahn SJ, Kim MJ, Yoon SH, Jo YH, Kim MS, Rhie DJ. (2006). *Serotonin inhibits the induction of NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the rat primary visual cortex*. *Brain Res.* 1103(1):49-55.
- Kim JJ, Baxter MG. (2001). *Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts*. *Trends Neurosci* 24(6): 324-30.
- Koga T, Sakai N, Tanaka C, Saito N. (1996). *Presynaptic and Ca(2+)-independent PKC subspecies modulates NMDAR1 current*. *Neuroreport* 7:477-480.
- Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. (2003). *Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin*. *Diabetes* 52(4):948-56.
- Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T. (2008). *Ghrelin raises [Ca²⁺]_i via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons*. *Biochem Biophys Res Commun.* 366(2):388-92.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999). *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. *Nature* 402:656-60.
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. (2001). *Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. *Trends Endocrinol Metab.* 12:118-22.
- Kojima M, Kangawa K. (2005). *Ghrelin: structure and function*. *Physiol Rev.* 85: 495-522.
- Kojima M, Kangawa K. (2010). *Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue*. *Ann N Y Acad Sci.* 1200:140-8.
- Kojima T, Matsumoto M, Togashi H, Tachibana K, Kemmotsu O, Yoshioka M. (2003). *Fluvoxamine suppresses the long-term potentiation in the hippocampal CA1 field of anesthetized rats: an effect mediated via 5-HT_{1A} receptors*. *Brain Res.* 959(1):165-8.
- Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB. (2001b). *The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in*

- normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 881–87.
- Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. (2001a). Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14:101-04.
- Koutkia P, Canavan B, Breu J, Johnson ML, Grinspoon SK. (2004). Nocturnal ghrelin pulsatility and response to growth hormone secretagogues in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:506-12.
- Lago F, Gonzalez-Juanatey JR, Casanueva FF, Gomez-Reino J, Dieguez C. (2005). Ghrelin, the same peptide for different functions: player or bystander? *Vitam Horm* 71: 405–32.
- Lattuada D, Crotta K, Tonna N, Casnici C, Benfante R, Fornasari D, Bianco F, Longhi R, Marelli O. (2013). The expression of GHS-R in primary neurons is dependent upon maturation stage and regional localization. *PLoS One* 8(6):e64183.
- Laurie DJ, Putzke J, Zieglgansberger W, Seeburg PH, Tolle TR. (1995). The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 32:94-108.
- Le Roux CW, Patterson M, Vincent RP, Hunt C, Ghatei MA, Bloom SR. (2005). Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1068-71.
- Lee YS and Silva AJ. (2009). The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10:126–40.
- Li E, Chung H, Kim Y, Kim DH, Ryu JH, Sato T, Kojima M, Park S. (2013). Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory. *Endocrine Journal* 60(6): 781-89.
- Lim E, Lee S, Li E, Kim Y, Park S. (2011). Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate-induced excitotoxicity via ERK1/2 and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathways. *Exp Neurol*. 230(1):114-22.
- Lin L, Saha PK, Ma X, Henshaw IO, Shao L, Chang BH, Buras ED, Tong Q, Chan L, McGuinness OP, Sun Y. (2011). Ablation of ghrelin receptor reduces adiposity and improves insulin sensitivity during aging by regulating fat metabolism in white and brown adipose tissues. *Aging Cell* 10:996-1010.
- Locatelli F, Maldonado H, Romano A. (2002). Two critical periods for cAMPdependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 77(2):234-49.

- Lomenick JP, Melguizo MS, Mitchell SL, Summar ML, Anderson JW. (2009). Effects of meals high in carbohydrate, protein, and fat on ghrelin and peptide YY secretion in prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 94(11):4463–71.
- Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res.* 730:32-9.
- Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S. (2001). Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus, *Neurosci Lett*, 321:157–160.
- Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, Birnbaum S, Yanagisawa M, Elmquist JK, Nestler EJ, Zigman JM. (2008). The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature Neuroscience* 11(7):752–53
- Mainardi M, Fusco S, Grassi C. (2015). Modulation of Hippocampal Neural Plasticity by Glucose-Related Signaling. *Neural Plasticity*. Hindawi Publishing Corporation: 1–10.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:649–711.
- Martin SJ, Morris RG. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12(5):609-36. Review.
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276:905-8.
- Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, Kangawa K. (2001). Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 287:142-46.
- Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M, Rebuffat P, Spinazzi R, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. (2004). Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides* 25: 1269-1277.
- McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR. (2002). Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175:7-11.
- McGaugh JL. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science* 287(5451):248-51.
- McGaugh JL. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 25-456. Review.

- McGaugh JL. (2004). *Memory reconsolidation hypothesis revived but restrained: theoretical comment on Biedenkapp and Rudy (2004)*. *Behav Neurosci*. 118(5):1140-2.
- McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. (1997a). *Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors*. *Mol Endocrinol* 11: 415-23.
- McKee KK, Tan CP, Palyha OC, Liu J, Feighner SD, Hreniuk DL, Smith RG, Howard AD, Van der Ploeg LH. (1997b). *Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors*. *Genomics* 46: 426-34.
- Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I. (2008). *Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate?* *Behav Brain Res*. 192 (1):61-9.
- Micheau J, Riedel G. (1999). *Protein kinases: which one is the memory molecule?* *Cell Mol Life Sci*. 55:534-48. Review.
- Milad MR, Quirk GJ. (2012). *Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress*. *Annu Rev Psychol*, 63:129-51.
- Mitchell V, Bouret S, Beauvillain JC, Schilling A, Perret M, Kordon C, Epelbaum J. (2001). *Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in Microcebus murinus (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary*. *J Comp Neurol*. 429(3):469-89.
- Miyamoto Eishichi. (2006). *Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus*. *Pharmacol Sci* 100:433-42
- Mizutani M, Atsuchi K, Asakawa A, Matsuda N, Fujimura M, Inui A, Kato I, Fujimiya M. (2009). *Localization of acyl ghrelin- and des-acyl ghrelin-immunoreactive cells in the rat stomach and their responses to intragastric pH*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 297(5):G974-80.
- Mnie-Filali O, El Mansari M, Espana A, Sánchez C, Haddjeri N. (2006). *Allosteric modulation of the effects of the 5-HT reuptake inhibitor escitalopram on the rat hippocampal synaptic plasticity*. *Neurosci Lett*. 395(1):23-7.
- Mokrosiński J, Frimurer TM, Sivertsen B, Schwartz TW, Holst B. (2012). *Modulation of constitutive activity and signaling bias of the ghrelin receptor by conformational constraint in the second extracellular loop*. *J Biol Chem*. 287(40):33488-502.
- Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. (1981). *Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro*. *Endocrinology* 108:31-39.

- Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K, Nakazato M. (2005). Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul Pept.* 126(1-2):55-9.
- Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Tsuruta T, Kangawa K, Nakazato M. (2005). Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. *Regul Pept.* 126(1-2):55-9.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12(3):529-40.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-40.
- Moon M, Choi JG, Nam DW, Hong HS, Choi YJ, Oh MS, Mook-Jung I. (2011). Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid- β 1-42 oligomer-injected mice. *J Alzheimers Dis* 23:147-59.
- Moon M, Kim S, Hwang L, Park S. (2009). Ghrelin regulates hippocampal neurogenesis in adult mice. *Endocr J.* 56(3):525-31.
- Morgado-Bernal I. (2011). Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* 176:12-19.
- Mori K, Togashi H, Kojima T, Matsumoto M, Ohashi S, Ueno K, Yoshioka M. (2001). Different effects of anxiolytic agents, diazepam and 5-HT(1A) agonist tandospirone, on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Pharmacol Biochem Behav.* 69(3-4):367-72.
- Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. (2000). Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett.* 486: 213-216.
- Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, ... Tschöp MH. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism* 4(6):437-60.
- Mundinger TO, Cummings DE, Taborisky GJ. (2006). Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. *Endocrinology* 147:2893-2901.
- Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. (2002). Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277:5667-74.
- Murphy JA, Stein IS, Lau CG, Peixoto RT, Aman TK, Kaneko N, Aromolaran K, Saulnier JL, Popescu GK, Sabatini BL, Hell JW, Zukin RS. (2014). Phosphorylation of Ser1166 on GluN2B by PKA

- is critical to synaptic NMDA receptor function and Ca²⁺ signaling in spines. *J Neurosci.* 34(3):869-79.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406(6797):722-26.
- Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K. (2004). Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation* 110:3674-79.
- Nakanishi S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nakanishi S. (1994). Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 13:1031-7.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-8.
- Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonits M. (2004). Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 151:233-40.
- Ni H, Walia P, Chanoine JP. (2010). Ontogeny of acylated ghrelin degradation in the rat. *Peptides.* 31(2):301-6.
- Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. (1987). Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J. Neurochem.* 49(1):50-7.
- Nicholls DG. (2003). Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal. *Neurochem Res.* 28(10):1433-41.
- Nicoll RA, Malenka RC. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-18. Review
- Nosten-Bertrand M, Errington ML, Murphy KP, Tokugawa Y, Barboni E, Kozlova E, Michalovich D, Morris RG, Silver J, Stewart CL, Bliss TV, Morris RJ. (1996). Normal spatial learning despite regional inhibition of LTP in mice lacking *Thy-1*. *Nature* 379(6568):826-9.
- O'Keefe J, Nadel L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford, Oxford University Press.
- Obay BD, Tasdemir E, Tümer C, Bilgin HM, Atmaca M. (2008). Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides* 29:448-55.
- Ohliger-Frerking P, Horowitz J, Horowitz B. (2002). Enhanced adrenergic excitation of serotonergic dorsal raphe neurons in genetically obese rats, *Neurosci Lett* 332:107-10.

- Ong H, McNicoll N, Escher E, Collu R, Deghenghi R, Locatelli V, Ghigo E, Muccioli G, Boghen M, Nilsson M. (1998). Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology* 139:432-35.
- Paoletti P, Neyton J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7:39-47.
- Passani MB, Pugliese AM, Azzurrini M, Corradetti R. (1994). Effects of DAU 6215, a novel 5-hydroxytryptamine₃ (5-HT₃) antagonist on electrophysiological properties of the rat hippocampus. *Br J Pharmacol*. 112(2):695-703.
- Paxinos G, Watson C. (2009). *The rat brain in stereotaxic coordinates, compact sixth edition*. San Diego, CA: Academic Press.
- Perez MF, Gabach LA, Almiron RS, Carlini VP, De Barioglio SR, Ramirez OA. (2010). Different chronic cocaine administration protocols induce changes on dentate gyrus plasticity and hippocampal dependent behavior. *Synapse*. 64(10):742-53.
- Porporato PE, Filigheddu N, Reano S, Ferrara M, Angelino E, Gnocchi VF, Prodam F, Ronchi G, Fagoonee S, Fornaro M, Chianale F, Baldanzi G, Surico N, Sinigaglia F, Perroteau I, Smith RG, Sun Y, Geuna S, Graziani A. (2013). Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 123:611-22.
- Portelli J, Michotte Y, Smolders I. (2012). Ghrelin: an emerging new anticonvulsant neuropeptide. *Epilepsia* 53(4):585-95.
- Prast H and Philippu A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*. 64(1):51-68.
- Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, LaMantia A, White L. (2012). *Neuroscience, Fifth Edition*. Sinauer Associates.
- Quillfeldt JA. (2006). *Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats*. vol. 21.
- Rauner C and Kohr G. (2011). Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J Biol Chem* 286, 7558-66.
- Redrobe JP, Dumont Y, St-Pierre JA, Quirion R. (1999). Multiple receptors for neuropeptide Y in the hippocampus: putative roles in seizures and cognition. *Brain Res* 848:153-66.
- Reiman K. (1993). Mechanisms underlying synaptic long term potentiation in the hippocampus: focus on postsynaptic glutamate receptors and protein kinases. *Functional Neurol*. 8:7-32.

- Ribeiro LF, Catarino T, Santos SD, Benoist M, van Leeuwen JF, Esteban JA, Carvalho AL. (2014). Ghrelin triggers the synaptic incorporation of AMPA receptors in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(1):E149-58.
- Rigamonti AE, Pincelli AI, Corrà B, Viarengo R, Bonomo SM, Galimberti D, Scacchi M, Scarpini E, Cavagnini F, Müller EE. (2002). Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 175:1-5.
- Rizzo M, Rizvi AA, Sudar E, Soskic S, Obradovic M, Montalto G, Boutjdir M, Mikhailidis DP, Isenovic ER. (2013). A review of the cardiovascular and anti-atherogenic effects of Ghrelin. *Current Pharmaceutical Design* 19:4953-63.
- Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R. (2002). Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3997-4000.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. (2002). Ghrelin producing cells exist as two types of cells, closed and opened type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23:531-36.
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, et al. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373(6510):151-5.
- Sarrar L, Ehrlich S, Merle JV, Pfeiffer E, Lehmkuhl U, Schneider N. (2011). Cognitive flexibility and Agouti-related protein in adolescent patients with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 36:1396-1406.
- Satou M, Nishi Y, Yoh J, Hattori Y, Sugimoto H. (2010). Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology* 151(10):4765-75.
- Schellekens H, De Francesco PN, Kandil D, Theeuwes WF, McCarthy T, van Oeffelen WE, Perelló M, Giblin L, Dinan TG, Cryan JF. (2015). Ghrelin's Orexigenic Effect Is Modulated via a Serotonin 2C Receptor Interaction. *ACS Chem Neurosci*. 6(7):1186-97.
- Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. (2010). Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* 58:2-16.
- Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, Koizumi S, Teno N. (2004). Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun*. 325(4):1487-94.

- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. (1994). Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368(6467):144-7.
- Shiia T, Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346:1623-30.
- Sillar KT, McLean DL, Fischer H, Merrywest SD. (2002). Fast inhibitory synapses: targets for neuromodulation and development of vertebrate motor behaviour. *Brain Res Brain Res Rev.* 40(1-3):130-40.
- Silva RC, Santos NR, Brandao ML. (2003). Influence of housing conditions on the effects of serotonergic drugs on feeding behavior in non-deprived rats. *Neuropsychobiology* 47(2):98-101.
- Simpson KL, Waterhouse BD, Lin RC. (2003). Differential expression of nitric oxide in serotonergic projection neurons: neurochemical identification of dorsal raphe inputs to rodent trigeminal somatosensory targets. *J Comp Neurol.* 466(4):495-512.
- Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, Holst B. (2013). Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - Opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *British Journal of Pharmacology* 170(7):1349-62.
- Smith JC, Whitton PS. (2000). Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. *Neurosci Lett.* 291(1):5-8.
- Smith RG, Leonard R, Bailey AR, Palyha O, Feighner S, Tan C, Mckee KK, Pong SS, Griffin P, Howard A. (2001). Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocr.* 14:9-14
- Soares JB, Leite-Moreira AF. (2008). Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle. *Peptides* 29(7):1255-70.
- Sprengel R, Suchanek B, Amico C, Brusa R, Burnashev N, Rozov A, Hvalby O, Jensen V, Paulsen O, Andersen P, Kim JJ, Thompson RF, Sun W, Webster LC, Grant SG, Eilers J, Konnerth A, Li J, McNamara JO, Seeburg PH. (1998). Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92:279-89.
- Squire LR, Zola SM. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(24): 13515-522.
- Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus* 18(11):1085-88.

- Struder HK, Weicker H. (2001). Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance: Part I. *Int. J. Sports Med.* 22: 467–81.
- Szentirmai E, Hajdu I, Obal Jr, F, Krueger JM. (2006). Ghrelin-induced sleep responses in ad libitum fed and food-restricted rats. *Brain Research* 1088:131-140.
- Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, Nakashima K. (2001). Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1522:62-65.
- Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. (2002). Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol.* 146:1-3.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401(6748):63-9.
- Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M and Tsien JZ. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41:779–90.
- Teyler J, Di Scenna P. (1987). Long-term potentiation. *Annu Rev Neurosci* 10:131–61.
- Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H, Theil J, von Hörsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T. (2009). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin. *J Immunol.* 183(4):2859-66.
- Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143:1353-61.
- Tong J, Dave N, Mugundu GM, Davis HW, Gaylinn BD, Thorner MO, Tschöp MH, D'Alessio D, Desai PB. (2013). The pharmacokinetics of acyl, des-acyl, and total ghrelin in healthy human subjects. *Eur J Endocrinol.* May 2;168(6):821-8. doi: 10.1530/EJE-13-0072
- Tong J, Mannea E, Aime P, Pfluger PT, Yi CX, Castaneda TR, Davis HW, Ren X, Pixley S, Benoit S, Julliard K, Woods SC, Horvath TL, Sleeman MM, D'Alessio D, Obici S, Frank R, Tschöp MH. (2011). Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31:5841-46.
- Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. (2001). Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281:1220-25.cumm

- Trabace L, Cassano T, Tucci P, Steardo L, Kendrick KM, Cuomo V. (2004). The effects of nitric oxide on striatal serotonergic transmission involve multiple targets: an in vivo microdialysis study in the awake rat. *Brain Res.* 1008(2):293-8.
- Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-13.
- Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. (2001). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707-09.
- Tulving E. (1987). Multiple memory systems and consciousness. *Hum Neurobiol.* 6:67-80.
- Unger MM, Möller JC, Mankel K, Eggert KM, Bohne K, Bodden M, Stiasny-Kolster K, Kann PH, Mayer G, Tebbe JJ, Oertel WH. (2011). Postprandial ghrelin response is reduced in patients with Parkinson's disease and idiopathic REM sleep behaviour disorder: a peripheral biomarker for early Parkinson's disease? *J Neurol* 258:982-90.
- Valenzuela-Harrington M, Gruart A, Delgado-García JM. (2007). Contribution of NMDA receptor NR2B subunit to synaptic plasticity during associative learning in behaving rats. *Eur J Neurosci.* 25(3):830-6.
- Van Der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-57.
- Vilcaes AA, Furlan G, Roth GA. (2009). Inhibition of Ca⁽²⁺⁾-dependent glutamate release from cerebral cortex synaptosomes of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 108(4):881-90.
- Vincent SR, Kimura H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46(4):755-84
- Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. (2002). Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 50:1013-21.
- Von Engelhardt J, Doganci B, Jensen V, Hvalby Ø, Göngrich C, Taylor A, Barkus C, Sanderson DJ, Rawlins JN, Seeburg PH, Bannerman DM, Monyer H. (2008). Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* 60:846-60.
- Wang D, Cui Z, Zeng Q, Kuang H, Wang LP, Tsien JZ, Cao X. (2009). Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS One.* 4(10):e7486.
- Wang H, Hu Y, Tsien JZ. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 79(3):123-135.

- Wang RY, Arvanov VL. (1998). M100907, a highly selective 5-HT_{2A} receptor antagonist and a potential atypical antipsychotic drug, facilitates induction of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 779(1-2):309-13.
- Warren MW, Hynan LS, Weiner MF. (2012). Leptin and cognition. *Dement Geriatr Cogn Disord* 33:410-15.
- Wegener G, Volke V, Rosenberg R. (2000). Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol.* 130(3):575-80.
- Weitlauf C, Honse Y, Auberson YP, Mishina M, Lovinger DM, Winder DG. (2005). Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Neurosci.* 25(37):8386-90.
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, and Benke D. (1997). NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68:469-78.
- Wenzel A, Scheurer L, Kunzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. (1995). Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 7:45-8.
- Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Flöel A. (2009). Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(4):1255-60.
- Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, Moncrieffe M, Thabet K, Cox HJ, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. (2004). Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(21):8227-32.
- Wu A, Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. (2003). A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 119(2):365-75.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. (2008). Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell*, 132(3), 387-96.
- Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM. (2011). Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146(6):992-1003.
- Yashiro K, Philpot BD. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology.* 55(7):1081-94.
- Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H. (2003). Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neuroscience Letters* 349:75-78.

- Yuen EY. (2005). Serotonin 5-HT_{1A} Receptors Regulate NMDA Receptor Channels through a Microtubule-Dependent Mechanism. *Journal of Neuroscience* 25(23):5488–5501.
- Zanatta MS, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH, Quevedo J, Quilfeldt JA, Izquierdo I. (1996). Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behav Pharmacol* 7:341-45.
- Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. (2005). Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310(5750):996-9.
- Zhang Q, Huang C, Meng B, Tang T, Shi Q, Yang H. (2012). Acute effect of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the rat spinal cord. *Int J Mol Sci* 13:9864-76.
- Zhao TJ, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Goldstein JL, Brown MS. (2010). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone mediated survival of calorie-restricted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:7467-72.
- Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, and Elmquist JK. (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 494:528–48.



*PUBLICACIONES
CIENTÍFICAS*

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se participó en la producción de las siguientes publicaciones:

- **Gherzi MS**, Gabach LA, Buteler F, Vilcaes AA, Schiöth HB, Perez MF, de Barioglio SR. Ghrelin increases memory consolidation through hippocampal mechanisms dependent on glutamate release and NR2B-subunits of the NMDA receptor. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015 May. 232(10):1843-57. doi: 10.1007/s00213-014-3817-6.
- Carlini VP, Machado DG, Buteler F, **Gherzi M**, Ponzio MF, Martini AC, Schiöth HB, de Cuneo MF, Rodrigues AL, de Barioglio SR. Acute ghrelin administration reverses depressive-like behavior induced by bilateral olfactory bulbectomy in mice. *Peptides*. 2012 Jun; 35(2):160-5. doi: 10.1016/j.peptides.2012.03.031.
- Carlini VP, **Gherzi M**, Gabach L, Schiöth HB, Pérez MF, Ramirez OA, Fiol de Cuneo M, de Barioglio SR. Hippocampal effects of neuronostatin on memory, anxiety-like behavior and food intake in rats. *Neuroscience*. 2011 Dec 1; 197:145-52. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.09.040.
- **Gherzi MS**, Casas SM, Escudero C, Carlini VP, Buteler F, Cabrera RJ, Schiöth HB, de Barioglio SR. Ghrelin inhibited serotonin release from hippocampal slices. *Peptides*. 2011 Nov; 32(11):2367-71. doi: 10.1016/j.peptides.2011.07.015.
- Glaser V, Carlini VP, Gabach L, **Gherzi M**, de Barioglio SR, Ramirez OA, Perez MF, Latini A. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2010 Oct; 30(7):1067-75. doi: 10.1007/s10571-010-9538-4.
- Carlini VP, **Gherzi M**, Schiöth HB, de Barioglio SR. Ghrelin and memory: differential effects on acquisition and retrieval. *Peptides*. 2010 Jun; 31(6):1190-3. doi: 10.1016/j.peptides.2010.02.021.