

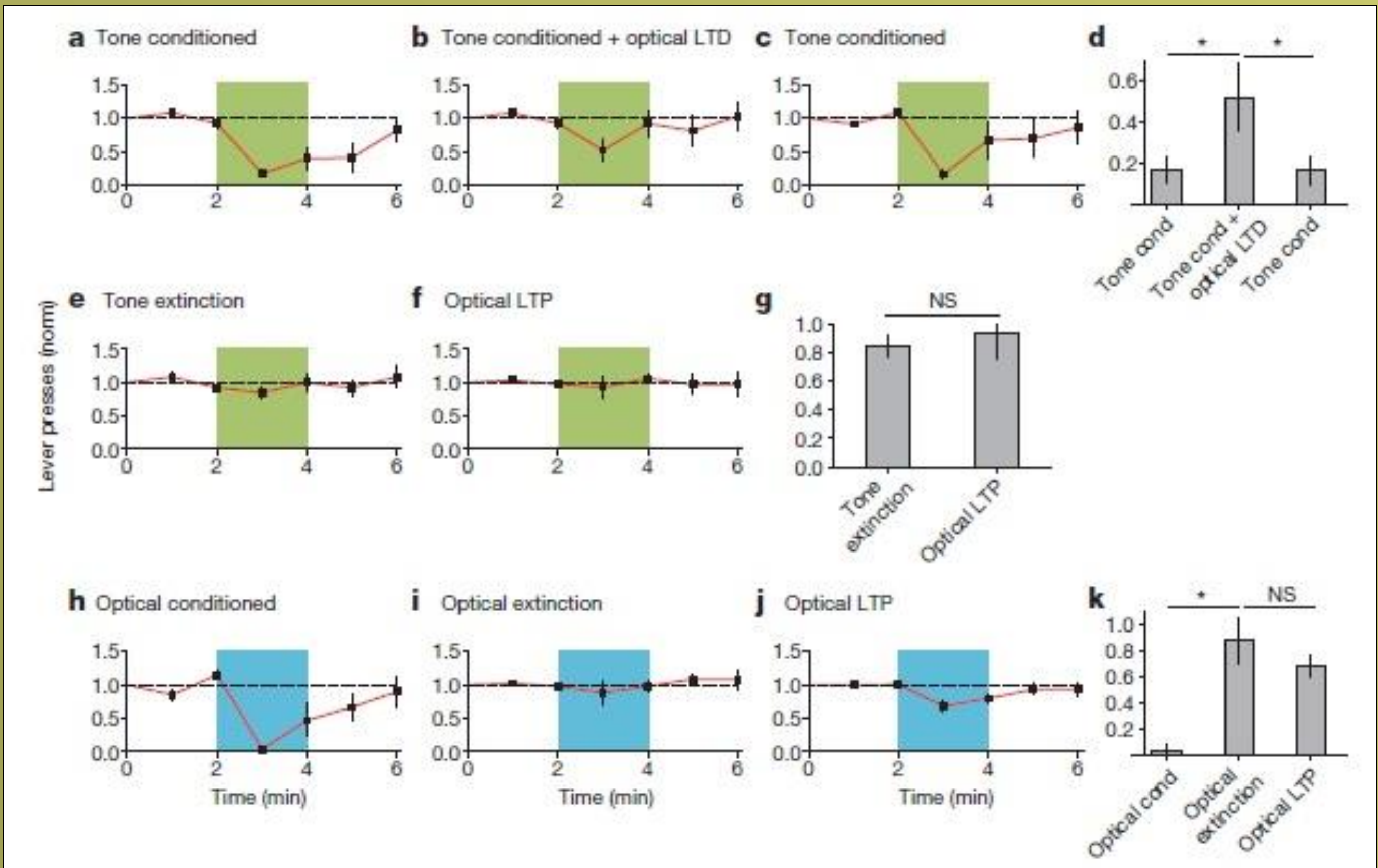
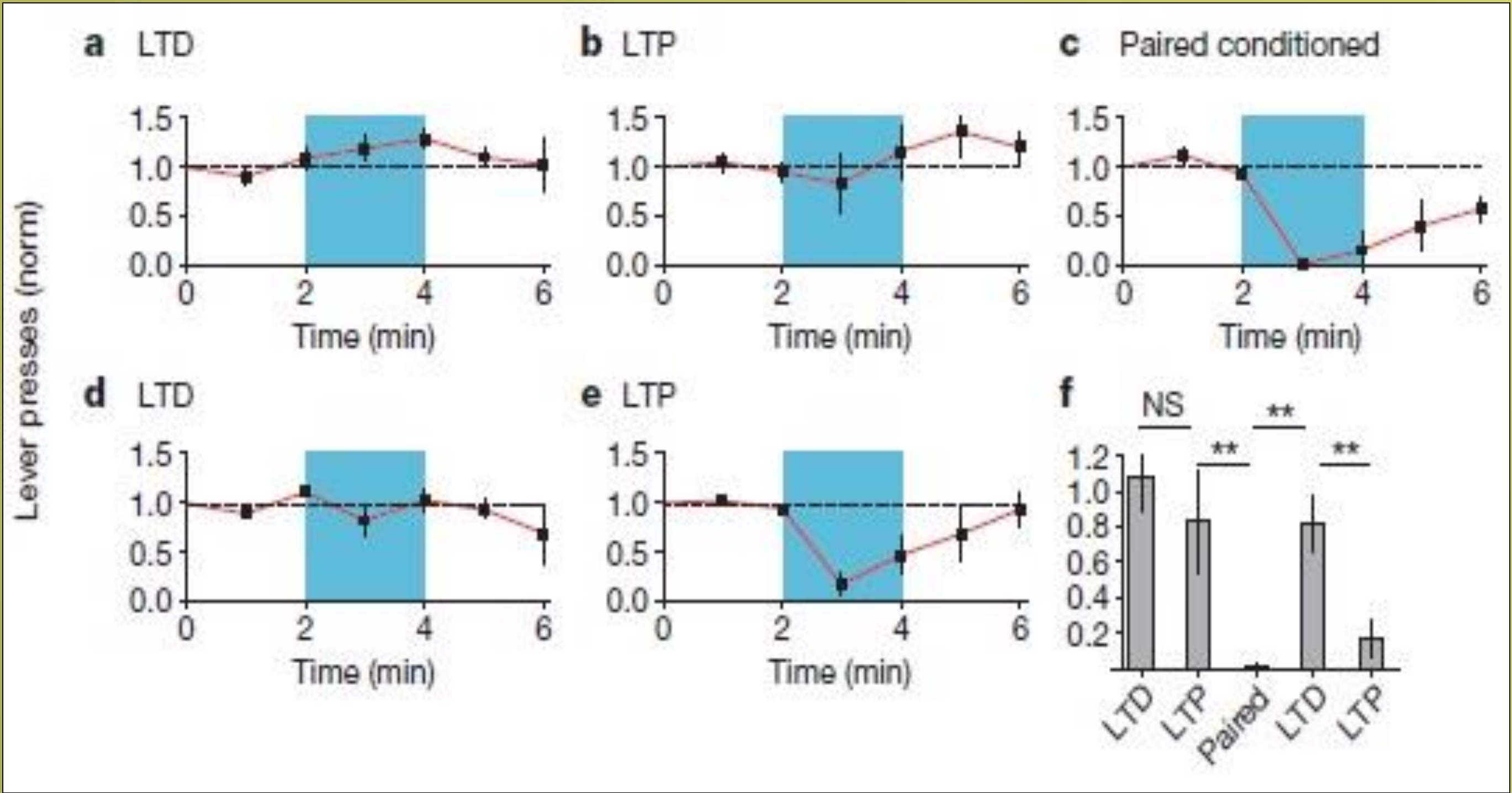
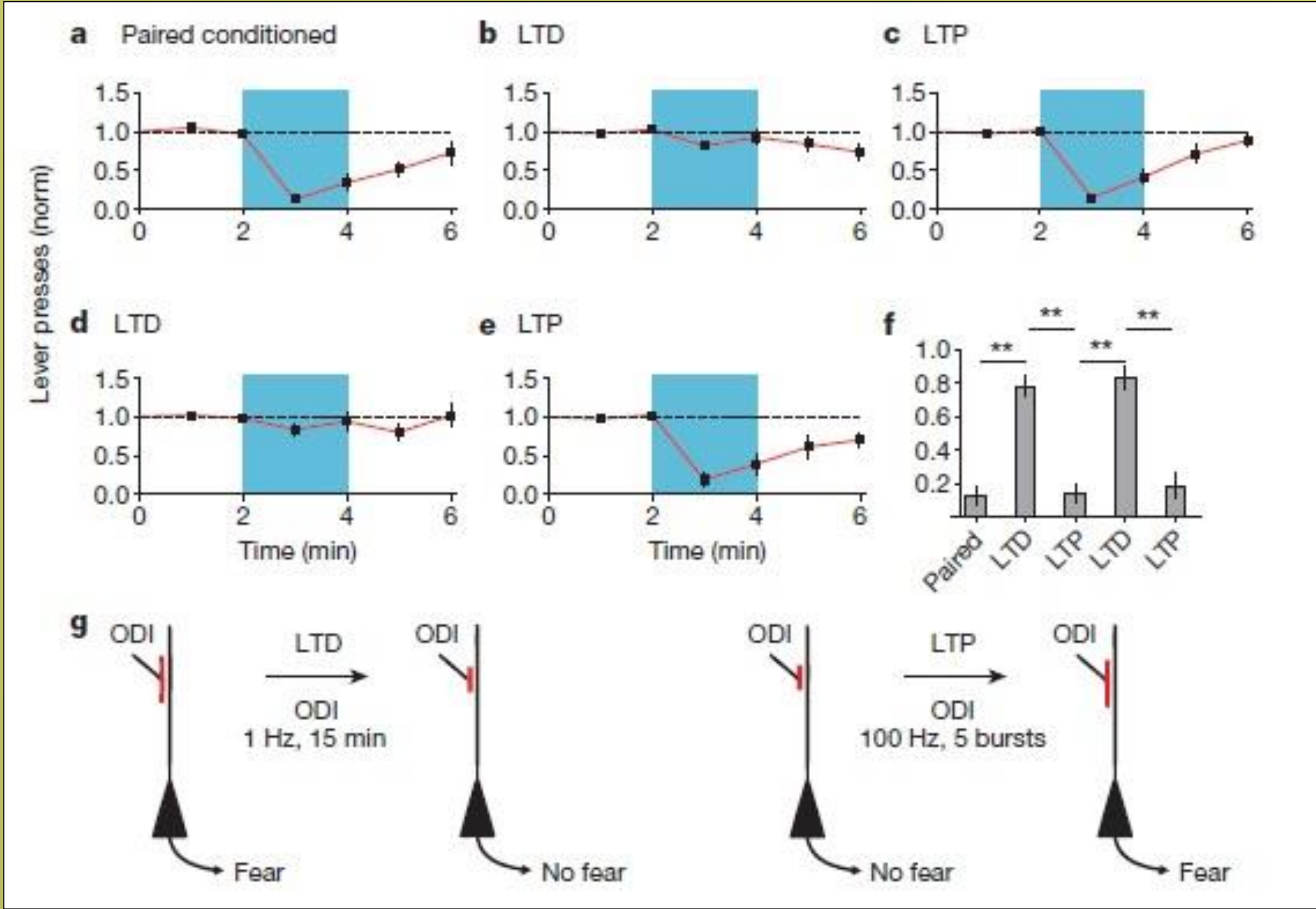
DISEÑO DE UNA MEMORIA CON LTD Y LTP

- Presentado por: [Alberto Lavín Robles¹](#) y [Federico Rodríguez Tosi¹](#)
- Carrera: ¹Carrera de Biotecnología y Farmacia. Universidad Francisco de Vitoria, Madrid
- Autores: [S. Nabavi^{1*}](#), [R. Fox^{1*}](#), [C. D. Proulx¹](#), [J. Y. Lin²](#), [R. Y. Tsien^{2, 3}](#) & [R. Malinow¹](#)
- Centros de trabajo: ¹Center for Neural Circuits and Behavior, Department of Neuroscience and Section of Neurobiology, University of California at San Diego, California 92093, USA. ²Department of Pharmacology, University of California at San Diego, California 92093, USA. ³Howard Hughes Medical Institute, University of California at San Diego, California 92093, USA. *These authors contributed equally to this work.

OBJETIVOS

Se ha propuesto que los recuerdos están codificados por la modificación de las fortalezas sinápticas a través de mecanismos celulares tales como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD). Sin embargo, el vínculo causal entre estos procesos sinápticos y la memoria ha sido difícil de demostrar. El objetivo de este experimento es poder comprender el funcionamiento del miedo, un tipo de memoria asociativa, utilizando como espécimen modelo, la rata.

GRÁFICOS



MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Sujeto: ratas Sparague-Dawley macho, madurados de 6-8 semanas con la inyección vírica y el posicionamiento de la cánula y de 10-12 semanas para estudios electrofisiológicos y comportamentales fueron acondicionados en parejas por caja y sometidos a ciclos de 12/12 horas de luz-oscuridad. Los estudios comportamentales eran realizados durante las horas de luz.

Virus: usaron una variante de ChR, denominada oChIEF, una versión optimizada ChIEF. Tiene las mismas propiedades pero es posee una expresión más potente en células mamíferas y posee un N-amino terminal adicional. La expresión fue conducida por un promotor de sinapsina específico de neuronas.

Procesos

Cirugía: las ratas fueron anestesiadas en el núcleo geniculado medial y en la corteza auditiva. Se inyectó el virus durante 10-15 minutos, al final de la inyección se dejó la pipeta en el sitio durante 5 minutos para permitir la difusión. Una cánula de fibra óptica fue implantada justo encima de la punta dorsal de la amígdala lateral, anclada al cráneo con tornillos y cemento dental.

Lesión excitotóxica: las ratas de 6 a 8 semanas fueron anestesiadas con isoflurano para una inyección estereotóxica de N-metil-D-aspartato (NMDA) en una amígdala durante 10-15 minutos, al final de la inyección se dejó la pipeta en el sitio durante 5 minutos para permitir la difusión.

Ensayos comportamentales

Entrenamiento: las ratas fueron entrenadas para asociar el apretar una palanca con una recompensa (solución de sacarosa) durante el periodo de entrenamiento las ratas fueron sometidas a un racionamiento de agua restringida. Se utilizó un habitáculo en cuyo interior había una palanca, un dispensador y una luz que se encendía una vez accionada la palanca, después de cada recompensa se producía un retraso de 15 segundos desde la salida de la cabeza del animal del dispensador. Por otro lado, debían ser capaces de relacionar el encendido de la luz con la aparición de la recompensa. Las ratas con un mínimo de 6 respuestas en los 10 primeros minutos de entrenamiento fueron seleccionadas para el acondicionamiento.

Acondicionamiento: en este caso, el habitáculo poseía un suelo de rejilla electrificado, las ratas tenían acceso al agua 24 antes del experimento. El protocolo consistía en 10 pruebas de un tono de 20 segundos con intervalos aleatorios (3 minutos de intervalo). Aquellos que iban por parejas, el fin de los tonos era acompañado por una descarga de 0,5 mA en las patas durante 0,5 segundos. En los otros casos, los tonos y la descarga tenían una separación de 1 minuto.

Acondicionamiento óptico: las ratas fueron puestas en la cámara de acondicionamiento y fueron unidas a una cuerda de fibra óptica, que a su vez estaba conectada a un diodo láser. Les era permitido explorar el habitáculo durante 3 minutos antes del acondicionamiento, en este caso, se aplican las mismas condiciones que el experimento anterior (rejilla electrificada), a excepción de que el estímulo es visual (luz azul).

Ensayo: tras el condicionamiento, las ratas fueron privadas de agua durante 24 horas antes de ser testadas del empuje de la palanca. El contexto de esta prueba era igual que las anteriores, si embargo, el suelo del habitáculo era de plástico con cintas rojas y blancas. La prueba consistía en una sesión de 7 minutos con el objetivo de apretar la palanca. Antes de esto, las ratas eran ancladas a la cuerda de fibra óptica, y dejadas explorar el receptáculo durante 5 minutos antes de tener acceso a la palanca. La prueba eran 3 minutos de oscuridad seguidos de 2 minutos de luz y después otros 2 minutos de oscuridad. Únicamente las ratas que mostraban una disminución consistente del empuje de la palanca durante el periodo de luz fueron usadas para posteriores fases. Aquellas que habían sido tratadas con estímulos sonoros, en vez de recibir 2 minutos de estimulación lumínica recibieron 2 minutos de tono.

Inducción de LTD: tras una hora después del ensayo, eran situadas en un recipiente translúcido de plástico, se las anclaba al cordón de fibra óptica y se les permitía explorar el medio durante 3 minutos con anterioridad a la inducción del LTD (900 pulsos de luz, 2ms cada uno). Tras la inducción las ratas permanecieron otros 3 minutos en el habitáculo antes de volver a su contenedor propio.

Inducción de LTP: tras una hora después del ensayo, las ratas fueron situadas en una caja de cartón, ancladas al cordón de fibra óptica y podían explorar libremente durante 3 minutos. El LTP fue inducido con 5 ráfagas de luz (cada una 100 pulsos) a intervalos de 3 minutos. Al igual que en el caso anterior, antes de volver a su habitáculo debían permanecer 3 minutos en el habitáculo.

Durante todos los ensayos comportamentales, la intensidad de la luz permaneció igual para todos los animales. Al final los animales fueron perforados y la localización de la fibra óptica fue verificada.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la **gráfica 1** podemos observar los resultados obtenidos tras el condicionamiento, posterior estudio del empuje de la palanca y sucesivas inyecciones de LTD y LTP permite atestiguar que los mencionados anteriormente poseen un papel importante en la regulación de la memoria asociativa, en este caso, el miedo. El LTP potencia el efecto de la memoria mientras que el LTD produce la degeneración de las conexiones celulares.

En la **gráfica 2** podemos observar tras los resultados obtenidos que el LTP sólo es capaz de generar una respuesta condicionada si anteriormente el animal ha sido sometido al condicionamiento (estímulo+descarga).

En la **gráfica 3** cabe destacar también que el procedimiento de LTP óptico, hace que disminuya el miedo en el condicionamiento acústico.

En la **gráfica 4** observamos los resultados obtenidos con el experimento a períodos largos, y podemos deducir que el efecto de LTP y LTD es rápido y es prolongado en el tiempo. Siendo los tiempos de estudio de 20 minutos y realizados cada 3 días.

