



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“EFECTO DE LA MOLÉCULA CD38 EN EL APRENDIZAJE
Y LA MEMORIA ESPACIAL EN UN MODELO MURINO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias de la Salud

PRESENTA

Q.F.B. Adriana Domínguez Rivas

Director de tesis:

Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba

Xalapa, Ver.

Diciembre, 2014.




ACTA DE EXAMEN CERRADO

ACTA NÚMERO TRES. En la Ciudad de Xalapa-Enríquez, Veracruz, México siendo las 14 horas con 35 minutos del día 5 del mes de diciembre de dos mil catorce, reunido el comité tutorial en la Sala de Juntas del Instituto de Ciencias de la Salud conformado éste por: M. en C. Isela Santiago Roque, Dra. María Sobelda L. Blázquez, Dr. Fabio A. García García, y Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba. Se procedió a examinar a la C. Adriana Domínguez Rivas alumna de la generación 2012-2014 y con matrícula S12015331, quien presentó la tesis titulada: "Efecto de la Molécula CD38 en el Aprendizaje y Memoria espacial en un modelo murino", como requisito para presentar el examen abierto, dentro del programa de la Maestría en Ciencias de la Salud. Acto seguido el comité deliberó en privado y, una vez hecho esto, se procedió a hacer la votación acerca del resultado, habiéndose determinado por mayoría que la C. Adriana Domínguez Rivas obtuvo _____ para la impresión de la tesis y la presentación del examen abierto para la defensa de la misma. Posteriormente el comité en pleno procedió a notificar a la alumna los resultados del examen cerrado, con las siguientes observaciones: Enriquecer la discusión, ampliar estadística, especificar hipótesis.

Firmado para constancia los que en el intervinieron, siendo las 14 horas con 35 minutos del día antes mencionado.

Comité tutorial


M. en C. Isela Santiago Roque


Dr. Fabio A. García García


Dra. María Sobelda L. Blázquez Morales


Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba

El presente trabajo de tesis fue financiado a través del recurso PROMEP/103.5/12/7966 y para la manutención del estudiante a través de la beca-comisión otorgada por la Secretaría de Educación de Veracruz a la C. Q.F.B. Adriana Domínguez Rivas en el periodo Agosto 2012-Julio 2014, con oficios SEV/OM/SRH/21666/2012, SEV/OM/SRH/2898/2013, SEV/OM/SRH/13683/2013, SEV/OM/SRH/14651/2013, SEV/OM/SRH/614 2014 y SEV/OM/SRH/8578/2014.

Agradecimientos

Al programa de Maestría y Doctorado del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana.

A la Dirección del Instituto de Ciencias de la Salud, Dra. Patricia Pavón León, a la Coordinación de la Maestría en Ciencias de la Salud, Dra. Ma. Sobeida L. Blázquez Morales.

Al Laboratorio de Neurotoxicología y su directora Mtra. Isela Santiago Roque, al Laboratorio del Sueño y su director Dr. Fabio A. García García y al Laboratorio de Cultivo celular y su director el Dr. Enríque Juárez Aguilar por el apoyo recibido en sus instalaciones para la realización del presente trabajo.

Al Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV y al Dr. Leopoldo Santos A. por su apoyo en la donación de pies de cría y uso de las instalaciones para la realización de experimentos; y al Instituto Nacional de Pediatría de la ciudad de México, especialmente a la Dra. Gabriela López H., por su apoyo y prestar las instalaciones del laboratorio de inmunodeficiencias para la realización de experimentos.

Al tutor Dr. Juan Carlos Rodríguez Alba, a los asesores Dra. Ma. Sobeida L. Blázquez Morales, Dr. Fabio A. García García y Mtra. Isela Santiago Roque, por sus consejos y apoyo incondicional para la realización de la presente tesis de grado.

Al Ex Rector de la Universidad Veracruzana, Dr. Raúl Arias Lobillo por su valioso apoyo para la participación en congresos internacionales.

A la Secretaria de Educación de Veracruz, por la autorización de la beca-comisión para la realización de la presente tesis de grado.

Al Telebachillerato del Estado de Veracruz por las facilidades y apoyo proporcionadas para la realización del presente trabajo.

Al Sindicato independiente de trabajadores del Estado de Veracruz SITEV por su apoyo incondicional para la formación profesional de sus agremiados, especialmente al Lic. Alberto Yopez Alfonso Secretario General, Dr. Rafael Wong Michel Asesor General y Mtra. Virginia Romero Aguilar secretaria del asesor general.

A todos los maestros que me transmitieron sus conocimientos con profesionalismo y dedicación.

A la Lic. Sandra A. Hernández L., Dra. Citlali Regalado S. y Dra. Montserrat Melgarejo G. por los valiosos conocimientos transmitidos y su apoyo para la elaboración de experimentos.

A Dios por siempre mostrarme el camino, a mi hijo Angel Yunuel por ser mi motor y mi fuerza, y a mis padres Roberto y Rebeca por brindarme su amor y apoyo incondicional en todo momento.

A mi tía Guille por sus valiosos consejos y ser como una segunda madre.

A mi abuelita Celia por mostrarme lo que significa aferrarse a la vida y ser feliz, así como a mi abuelita Eustolia Q.E.P.D. por siempre creer en mí.

A mis hermanos y demás familiares y amigos por estar ahí animándome a continuar y lograr mis metas: Rebeca, Ramón, Claudia, Tía Sol, Antonio Olayo, Lucio Pedro, Elia Sánchez., Alonso Sánchez y Ramón Castillo.

RESUMEN

Para determinar el efecto de CD38 en el aprendizaje y la memoria espacial, en ratones machos y hembras de tres meses de edad, se utilizó el test de Laberinto Acuático de Morris (LAM) con grupos de 15 machos y 10 hembras de cada cepa de ratones CD38+/+ y CD38-/. Además para evaluar la expresión de CD38 en hipocampo se realizaron ensayos tipo Western Blot (WB) en 2 machos y 2 hembras de cada cepa de ratones.

La expresión de CD38 fue diferencial con respecto al sexo de los ratones, el hipocampo de los machos presentó mayor expresión de la proteína con respecto al hipocampo de las hembras. De manera interesante, también fue diferencial en cada hemisferio cerebral, siendo el hipocampo izquierdo de los machos e hipocampo derecho de las hembras los que mostraron mayor expresión de CD38. Los ratones hembra CD38-/- presentaron diferencia significativa con respecto a las hembras CD38+/+ y a los machos de su misma cepa en la primera fase del test, la memoria de trabajo. En la fase de aprendizaje, los machos CD38-/- y hembras CD38-/- tuvieron un menor desempeño con respecto a sus congéneres CD38+/+. En la fase final del test, la memoria espacial, los ratones CD38-/- permanecieron significativamente menor tiempo en el cuadrante objetivo con respecto a los ratones CD38+/+. Interesantemente, las hembras CD38-/- y CD38+/+ presentaron una desorientación espacial, misma que se observó al pasar el mismo tiempo en el cuadrante objetivo y en el cuadrante contiguo "C2".

En conjunto, los resultados sugieren un dimorfismo sexual en la expresión de CD38 en ratones de 3 meses así como una lateralización hemisférica; además de una deficiencia en el aprendizaje, la memoria de trabajo y la memoria espacial cuando CD38 no está presente, que afecta particularmente a machos en el aprendizaje y la memoria espacial y a hembras en la memoria de trabajo, aprendizaje y memoria espacial.

Palabras clave: CD38, aprendizaje y memoria espacial, LAM, déficit, expresión diferencial.

Abstract

To examine the effect of CD38 on learning and spatial memory and hippocampal expression in male and female three months old mice, Morris Water Maze (MWM), (n=15 male and n=10 female of CD38^{-/-} and CD38^{+/+}) and Western Blot analysis (n=2 male and female mice) were used.

CD38 expression in extracts from CD38^{+/+} hippocampus male and female mice was differential. Male hippocampus was expressed more CD38 than female. Furthermore, differential expression between right and left brain hemisphere was observed.

Female CD38^{-/-} mice showed significant difference from females CD38^{+/+} and males of the same strain in the first phase of MWM, working memory. In the learning phase, CD38^{-/-} male and CD38 female had a lower performance relative to their counterparts CD38^{+/+}. In the final phase of the test, spatial memory, CD38^{-/-} mice remained significantly less time in the target quadrant over CD38^{+/+} mice. Interestingly, CD38^{-/-} and CD38^{+/+} females presented a spatial disorientation; they required the same time in target quadrant and the adjacent quadrant "C2".

Thereby, these results suggest a differential expression of CD38 in 3 months old mice (involving sex and cerebral hemisphere) and a deficiency in learning and spatial memory when CD38 is lacking, which particularly affects males in learning and spatial memory and females in working memory, learning and spatial memory.

ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adrenocorticotropa, corticotropina o corticotrofina

ADP: Adenosín di fosfato

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

cADPR: Adenosín di fosfato ribosa cíclico

CREB-1: proteína de unión al elemento de respuesta cAMP-1

CREB-2: proteína de unión al elemento de respuesta cAMP-2

E-LTP: Fase temprana de la potenciación a largo plazo

GABA: Ácido gamma amino butírico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

HIV-1: Virus de inmunodeficiencia humana-1

HIV-1gp120: Proteína superficial gp120 de la envoltura del virus de inmunodeficiencia humana

IgM: Inmunoglobulina tipo M

IgG1: Inmunoglobulina tipo G subclase1

IgE: Inmunoglobulina tipo E

IL-1 β : Interleucina 1 tipo beta

LAM: Laberinto acuático de Morris

LTP: Potenciación a largo plazo

L-LTP: Fase tardía de la potenciación a largo plazo

MAPK: Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MTE: Memoria de trabajo espacial

NA: Ácido nicotínico

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

NAD $^{+}$: Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado

NAADP: Ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NMDA: receptor n-metil -D aspartato

NTRK3: Receptor tirosina cinasa de neurotrofina tipo 3

PKA: Proteína cinasa "A"

WB: Western Blot

INDICE DE CONTENIDO.

INTRODUCCIÓN	1
1. CAPÍTULO I	
1.1 Antecedentes	
1.1.1 Definición de memoria.....	3
1.1.2 Tipos de memoria.....	4
1.1.3 Sustrato anatómico de la memoria.....	7
1.1.4 Sustrato neuroquímico de la memoria.....	10
1.1.5 Hipocampo.....	13
1.1.6 Descripción de CD38.....	15
1.1.7 Funciones de CD38.....	16
1.1.8 Ligando de CD38.....	17
1.1.9 Ratón knock out de CD38.....	18
1.1.10 CD38 y cerebro.....	18
1.1.11 CD38 y neuroinmunología.....	19
1.1.12 Test de Laberinto Acuático de Morris.....	20
1.2 Planteamiento del problema.....	23
1.3 Justificación.....	23
1.4 Hipótesis de investigación.....	24
1.5 Objetivo General.....	24
1.5.1 Objetivos específicos.....	24
2. CAPÍTULO II	
2.1 Material y métodos	
2.1.1 Aspectos generales.....	25
2.1.2 Tipo de estudio.....	25
2.1.3 Población de estudio.....	25
2.1.4 Criterios de inclusión, exclusión y de eliminación.....	25
2.1.5 Variables.....	26
2.1.6 Procedimiento de recopilación de datos.....	26
2.1.7 Procesamiento estadístico.....	27

2.1.8	Métodos	
2.1.8.1	Tinción por citometría de flujo.....	27
2.1.8.2	Ensayos tipo Western Blot.....	28
2.1.8.3	Test de Laberinto Acuático de Morris.....	29
3.	CAPÍTULO III	
3.1	Resultados	33
4.	CAPÍTULO IV	
4.1	Discusión.....	40
4.2	Conclusiones.....	45
4.3	Recomendaciones.....	45
4.4	Limitaciones.....	46
4.5	Consideraciones éticas y de bioseguridad.....	46
	BIBLIOGRAFÍA.....	47
	ANEXOS.....	61

INTRODUCCIÓN

Parte importante de los estudios de las neurociencias se enfocan en la capacidad de identificar el origen, desarrollo y evolución de aquello que altere el equilibrio funcional del cerebro, puesto que es el órgano más grande del sistema nervioso central y en el cual recae el control de funciones cognitivas y orgánicas. Podemos mencionar dentro de las funciones cognitivas a la **memoria**, el **aprendizaje**, el razonamiento y el procesamiento del lenguaje, entre otras.

Recientemente, se han establecido relaciones transdisciplinarias como la neuroinmunología, la psiconeuroinmunología y la psiconeuroinmunoendocrinología, con el propósito de comprender las relaciones que existen entre los 4 sistemas regulatorios corporales, sobre todo, porque existen recientes investigaciones que sugieren que un desequilibrio entre ellos generan padecimientos tales como esclerosis múltiple y trastornos del espectro autista, así como procesos neurodegenerativos como el Alzheimer o Parkinson, entre otros.

Un ejemplo de estudios que nos sugieren estrechas relaciones entre el cerebro y moléculas del sistema inmune, son los relacionados a **CD38**.

CD38 es una proteína transmembranal de 42 kDa. Posee funciones ampliamente descritas como receptor y enzima, las cuales promueven activación, diferenciación, proliferación y migración celular en el sistema inmunológico; además, se ha descrito su función como un potente movilizador de calcio intracelular a través de la catálisis de los segundos mensajeros cADPR y NAADP. Por otra parte, la ausencia de CD38 tiene como consecuencia deficiencias en la respuesta inmune así como alteraciones en el reconocimiento social y cuidado materno, esto último debido a que la actividad enzimática de CD38 es indispensable en la secreción de oxitocina del hipotálamo y pituitaria. Asimismo se ha descrito que la activación de CD38 en astrocitos promueve la formación de cADPR, hecho que regula la liberación de diferentes neurotransmisores como

glutamato y GABA; los cuales, están involucrados en procesos neuronales de memoria y aprendizaje. Otras investigaciones han evaluado la distribución y la actividad enzimática de CD38 en el hipocampo, principal integrador de los circuitos implicados en dichas funciones, sin embargo, no existen reportes que demuestren la participación de CD38 en el aprendizaje y la memoria.

Es por ello, que en el presente trabajo se analizó el papel que CD38 posee en el aprendizaje y la memoria espacial en el ratón knockout de CD38 (CD38^{-/-}) de 3 meses de edad mediante la prueba de Laberinto Acuático de Morris (LAM).

CAPÍTULO I

1.1 Antecedentes

1.1.1 Definición de memoria.

El aprendizaje puede ser descrito como el mecanismo mediante el cual la nueva información acerca del mundo es adquirida, y la memoria como el mecanismo por el cual se retiene el conocimiento (Lynch, 2004).

La memoria se convirtió en un tema de investigación experimental en la primera mitad del siglo XX. Dichos estudios comenzaron a mediados de la década de 1960 con pacientes amnésicos, sujetos normales y animales de experimentación (Squire, 2004). El hallazgo de que algunas habilidades de la memoria están intactos en la amnesia (por ejemplo, el aprendizaje de habilidades y efectos a nivel de la adaptación) ha sugerido que la memoria se puede dividir en dos o más procesos separados (Squire, 2007) y soportados por diversas áreas cerebrales. (Tabla 1).

Tabla 1. Áreas implicadas en aprendizaje y memoria.

Tipo de Aprendizaje/Memoria	Áreas del cerebro involucradas
Aprendizaje espacial	Hipocampo Parahipocampo Subículum Corteza Corteza temporal Área 47 Corteza parietal posterior
Memoria emocional	Amígdala
Memoria de reconocimiento	Hipocampo Lóbulo temporal
Memoria de trabajo	Hipocampo Corteza prefrontal
Habilidades motoras	Estriado Cerebelo
Sensorial (visual, auditivo, táctil)	Varias áreas corticales
Condicionamiento clásico	Cerebelo
Habitación	Ganglios Basales

Fuente: Lynch, 2004, modificado 2014.

1.1.2 Tipos de Memoria.

Larry Squire en 1987 une sus ideas a las de Endel Tulving, generadas en 1985, para crear una representación de los tipos de memoria (Fig. 1):

- La memoria declarativa o memoria explícita, puede ser dividida en memoria semántica (hechos acerca del mundo) y en memoria episódica (la capacidad de volver a experimentar un suceso en el contexto en el cual éste ocurrió originalmente) (Tulving, 1985). Este tipo de memoria, provee una idea del mundo, en el cual las cosas son ciertas o falsas.
- La memoria no declarativa, no es ni verdadera ni falsa, se forma a partir de un hábito, de un condicionamiento clásico o aprendizaje no asociativo y los recuerdos se revelan a través de la reactivación de los sistemas en los que se produjo inicialmente el aprendizaje (Squire, 2004).

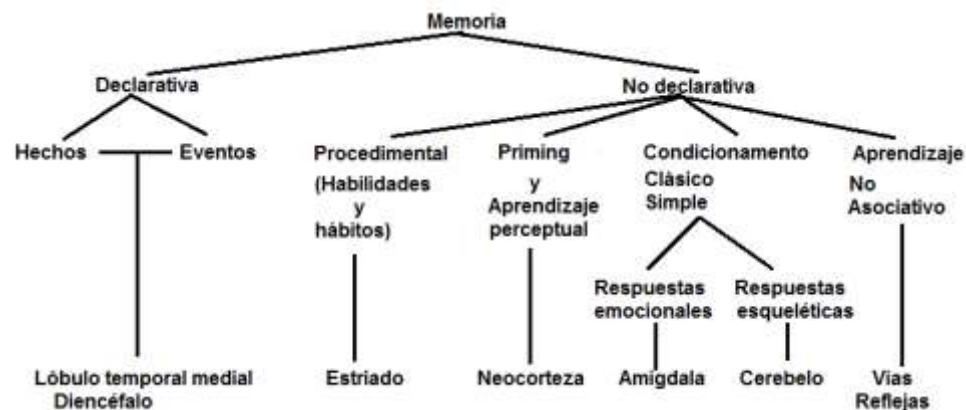


Fig. 1 Taxonomía en mamíferos de los sistemas de memoria a largo plazo. Además, de su papel central en el aprendizaje emocional, la amígdala es capaz de modular la fuerza de la memoria declarativa y no declarativa. Fuente: Squire, 2004, modificada 2014.

Sin embargo, esta clasificación dejaba de lado otro tipo de memoria igualmente importante:

- La memoria de trabajo, descrita en 1974 por Alan Baddeley y Graham Hitch. Ellos la explican como un proceso cognitivo que permite la percepción, a través del tiempo, momento a momento, para ser integrado, ensayado y combinado con acceso simultáneo a la información archivada sobre las experiencias, acciones o conocimientos pasados. Dicho modelo consiste en un sistema en el cual la memoria es un almacén temporal a corto plazo que funciona a través de un sistema ejecutivo central y dos subsistemas esclavos: una pizarra viso-espacial y un circuito fonológico.(Fig. 2)



Fig. 2 Modelo de la memoria de trabajo de Baddeley & Hitch, 1976.
Fuente: Gutiérrez y Fernández, 2011. Modificado, 2014.

El ejecutivo central es un sistema flexible, responsable de administrar los sistemas esclavos y se encarga de dirigir la atención y “decidir” qué información almacenar. La pizarra viso-espacial es un subsistema que contiene información visual y espacial; y es en éste último donde se ubica a la memoria de trabajo espacial (MTE). La MTE se refiere al almacenamiento por un tiempo corto y limitado de información espacial, la cual está relacionada a la posición de los objetos en el medio ambiente y poco después de ser almacenada, esta información es degradada o bien reemplazada por nueva información (Gutiérrez y Fernández, 2011).

Varios autores proponen la clasificación de la memoria en dos etapas (clasificación simple):

- Memoria a corto plazo, que implica la modificación covalente de proteínas preexistentes y cambios en la fuerza de la conexión sináptica, este tipo de memoria, reconoce a una forma especializada, la memoria de trabajo, la cual almacena temporalmente la información proveniente de un ambiente que provee pistas para la ejecución de una actividad a corto plazo (Touzani, et al., 2007). Deficiencias en este sistema causados por la edad, se manifiestan por dificultades en memorización, en la realización de actividades diarias programadas y en la resolución de diferentes tipos de problemas; además, personas con trastornos mentales o conductuales también presentan alteraciones en dicho sistema (Brodziak, et al., 2013).
- Memoria a largo plazo, requiere la síntesis de nuevas proteínas y el crecimiento de nuevas conexiones (Kandel, 2009; Mayford et al., 2012), esta memoria es usualmente dividida en declarativa (explícita) y en procedimental (implícita).
 - Memoria declarativa, incluye toda la información que está disponible en la conciencia, y puede ser dividida en episódica (eventos específicos) y en semántica (conocimiento acerca del mundo).
 - Memoria procedimental, es información acerca de los movimientos corporales y procedimientos para usar objetos en el entorno (Brodziak, et al., 2013).

Otro tipo de memoria que no se incluye en la clasificación anterior, pero que participa de la memoria a corto y largo plazo es la siguiente:

- Memoria Espacial, consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Kessels et al., 2001). La orientación espacial es importante para muchos de los repertorios conductuales: búsqueda de comida,

conducta parental y reproductiva, regreso al nido o huída a un lugar seguro (Vicens, Redolat y Carrasco, 2003), recordar la ubicación, los objetivos distales y navegar eficientemente hacia ellos evitando al mismo tiempo peligros y obstáculos (Hartley, Lever, Burgess & O'Keefe, 2013).

1.1.3 Sustrato anatómico de la memoria.

Como se ha mencionado, distintos tipos de memoria parecen poseer gran variedad de sustratos anatómicos (Fig. 1) y diversas investigaciones apoyan esta información:

- Memoria declarativa.- Requiere del lóbulo temporal medial y del hipocampo (Scoville & Milner, 1957; Squire, 1992; Schacter & Tulving, 1994). Extensas proyecciones convergentes y divergentes vinculan el hipocampo a muchas áreas de la corteza cerebral, donde es probable que se produzca el procesamiento y almacenamiento de información nueva, es tal vez, por medio de estas conexiones que el hipocampo opera y participa sobre las representaciones declarativas (Squire, 1987). (Fig.3).

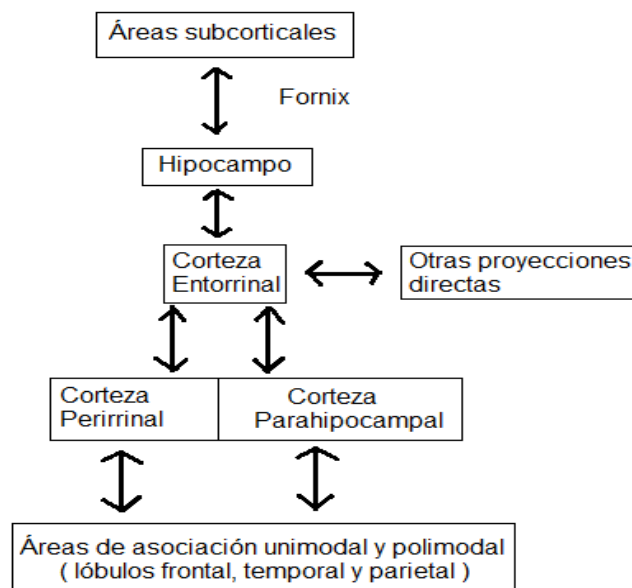


Fig. 3. Estructuras de la región hipocámpica que median la memoria declarativa de Zola-Morgan, et al. Fuente: Zigmond MJ. Fundamental Neuroscience. Academic Press, 1999; modificada 2014. p.1465

- La memoria procedimental involucra gran variedad de sistemas cerebrales, tales como el cerebelo, cuerpo estriado y amígdala (Kandel, 2009).
- El sistema de memoria de trabajo ha sido asociado con la corteza prefrontal, sin embargo, evidencias anatómicas y fisiológicas sugieren que la corteza prefrontal es parte de una red más amplia de áreas cerebrales interconectadas; éstas incluyen las áreas parietal y temporal de la corteza cerebral, la corteza singular y las áreas límbicas así como estructuras subcorticales tales como el tálamo dorsomedial y los ganglios basales (Constantinidis & Procyk, 2004). Además, estudios neurofisiológicos en primates confirman la implicación de áreas más allá del lóbulo frontal e ilustran que la memoria de trabajo involucra una distribución de redes neuronales paralelas (Brodziak et al., 2013). (Fig. 4).
- La memoria espacial se relaciona al hipocampo, sobre todo a algunas de sus neuronas que poseen propiedades espaciales (Hartley, Lever, Burgess & O'Keefe, 2013):
 - Células de lugar, son las principales células del hipocampo y del giro dentado y disparan a una velocidad baja durante la mayor parte del tiempo en el ambiente en general, pero que aumenta su disparo cuando el animal está dentro de una región limitada del entorno (su "lugar de campo")
 - Células HD (células de dirección de cabeza), se encuentran en el presubíulum dorsal y la corteza entorrinal; aunque también están presentes en otras regiones fuera del hipocampo como núcleo talámico dorsal anterior y la corteza retrosplenial; proporcionan una representación aloentrónica, independiente de la ubicación.

- Células de red, se identificaron por primera vez en la corteza entorrinal media y posteriormente en el pre y parasubiculum. Al igual que las células de lugar, disparan en lugares específicos del ambiente, pero a diferencia de éstas, poseen múltiples campos de disparo que representa al medio ambiente como un mosaico con un patrón triangular regular.
- Células de frontera, como su nombre lo indica, se activan para determinar los límites del entorno; también se han encontrado en subículum, corteza entorrinal media, presubiculum y parasubiculum.

Daños a la parte posterior de la circunvolución del hipocampo conduce a una desorientación topográfica, deficiencia específica de la memoria espacial y de comportamiento así como afectaciones a la región retrosplenial/medial parietal también conlleva a problemas de navegación (Hartley et al., 2013).

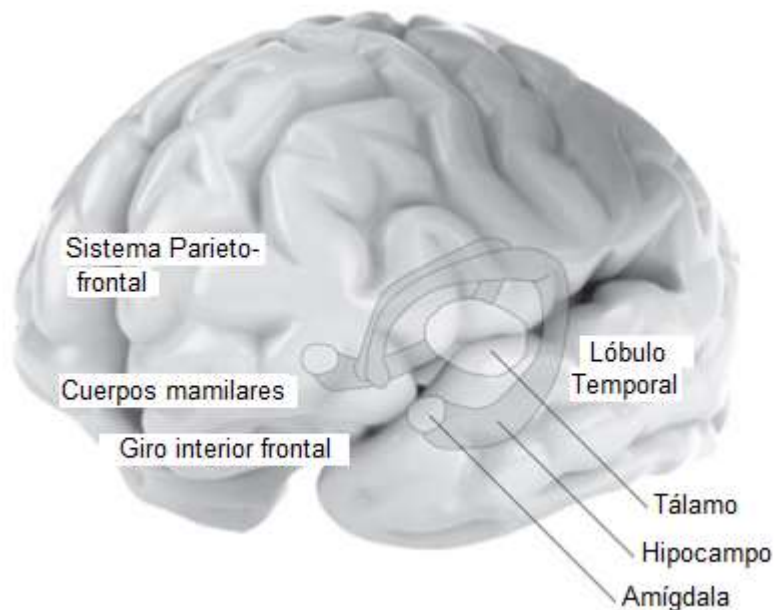


Fig. 4. Localización anatómica de los elementos del sistema de la memoria de trabajo. Fuente: Brodziak et al., 2013, modificada 2014.

1.1.4 Sustrato neuroquímico de la memoria

La formación de la memoria en las estructuras cerebrales ha seguido dos vertientes:

- El enfoque del campo agregado, que tuvo auge la década de 1950 con Karl Lashley y en la década de 1960 con Ross Adey, mantenía la idea de que la información era almacenada en el campo bioeléctrico generado por la actividad agregada de muchas neuronas.
- El enfoque conexionista celular, deriva de la idea de Santiago Ramón y Cajal en 1894, en el que los resultados de aprendizaje son debidos a modificaciones en la fuerza de la sinapsis. Esta idea posteriormente fue llamada plasticidad sináptica (Kandel, 2009).

Investigaciones sobre el hipocampo revelaron que las sinapsis de la vía perforante, poseen plasticidad notable y esta capacidad puede servir para almacenar memoria (Kandel, 2009). Las tres principales vías del hipocampo son muy sensibles a la historia de la actividad anterior, un breve tren de potenciales de acción de alta frecuencia (tetánico), en cualquiera de las tres, refuerza la transmisión sináptica, aumentando la amplitud de los potenciales excitatorios postsinápticos en las neuronas hipocampales. Dicho tren excitatorio se conoce como potenciación a largo plazo (LTP de sus siglas en inglés), descrita por primera vez por Tim Bliss y Terje Lomo en 1973 (Shapiro & Eichenbaum, 1999).

Los mecanismos que subyacen LTP no son los mismos en las tres vías:

- En las vías perforante y colateral de Schaffer, LTP es asociativa, requiere actividad presináptica seguida de actividad postsináptica.
- En la vía de las fibras musgosas, LTP es no asociativa, no requiere actividad coincidente (Bliss & Collingridge, 1993).

➤ LTP en la vía colateral de Schaffer requiere que el receptor NMDA (bloqueado por Mg^{2+}) se desbloquee cuando la célula postsináptica se despolariza, que normalmente se produce sólo en respuesta a una ráfaga de potenciales de acción presinápticos; esto es, para liberar el bloqueo de Mg^{2+} , la neurona presináptica se debe activar para proporcionar glutamato justo antes de que la célula postsináptica dispare un potencial de acción (Bliss & Collingridge, 1993).

Richard Morris hizo la primera conexión de LTP a la memoria espacial demostrando que los receptores NMDA deben ser activados para que se produzca el aprendizaje espacial en ratas (Kandel, 2009), posteriormente Tsien y Susumu Tonegawa crearon una línea de ratón knockout de los receptores NMDA sólo en las neuronas piramidales CA1 (Tsien, 1996), mostrando la importancia de LTP en la memoria espacial mediada por receptores NMDA en la vía colateral de Schaffer (Tsien, Huerta & Tonegawa, 1996).

LTP en el hipocampo ha demostrado poseer dos fases, inicial y tardía. Uno de los trenes de estímulos produce la fase temprana (E-LTP) que dura 1-3 horas y no requiere la síntesis de proteínas. Cuatro o más trenes inducen la fase tardía (L-LTP) que dura al menos 24 horas, requiere la síntesis de proteínas y se activa por proteína cinasa A (PKA) (Abel et al., 1997). A diferencia de la primera fase, que puede implicar cambios presinápticos o postsinápticos, la última fase depende de un cambio coordinado en la estructura, tanto de la célula presináptica como la postsináptica, a través de la acción de uno o más mensajeros ortógrados y anterógrados que aseguren la remodelación ordenada y coordinada (Kandel, 2009) (Fig. 5).

Los mecanismos moleculares que transforman la memoria de corto plazo en memoria de largo plazo poseen vías de señalización en común, ambas usan PKA, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteína de unión al elemento de respuesta cAMP-1 (CREB-1) que es promotor de

almacenamiento de memoria y proteína de unión al elemento de respuesta cAMP-2 (CREB-2) que es supresor de crecimiento de conexiones sinápticas (Mayford, Siegelbaum & Kandel, 2012).

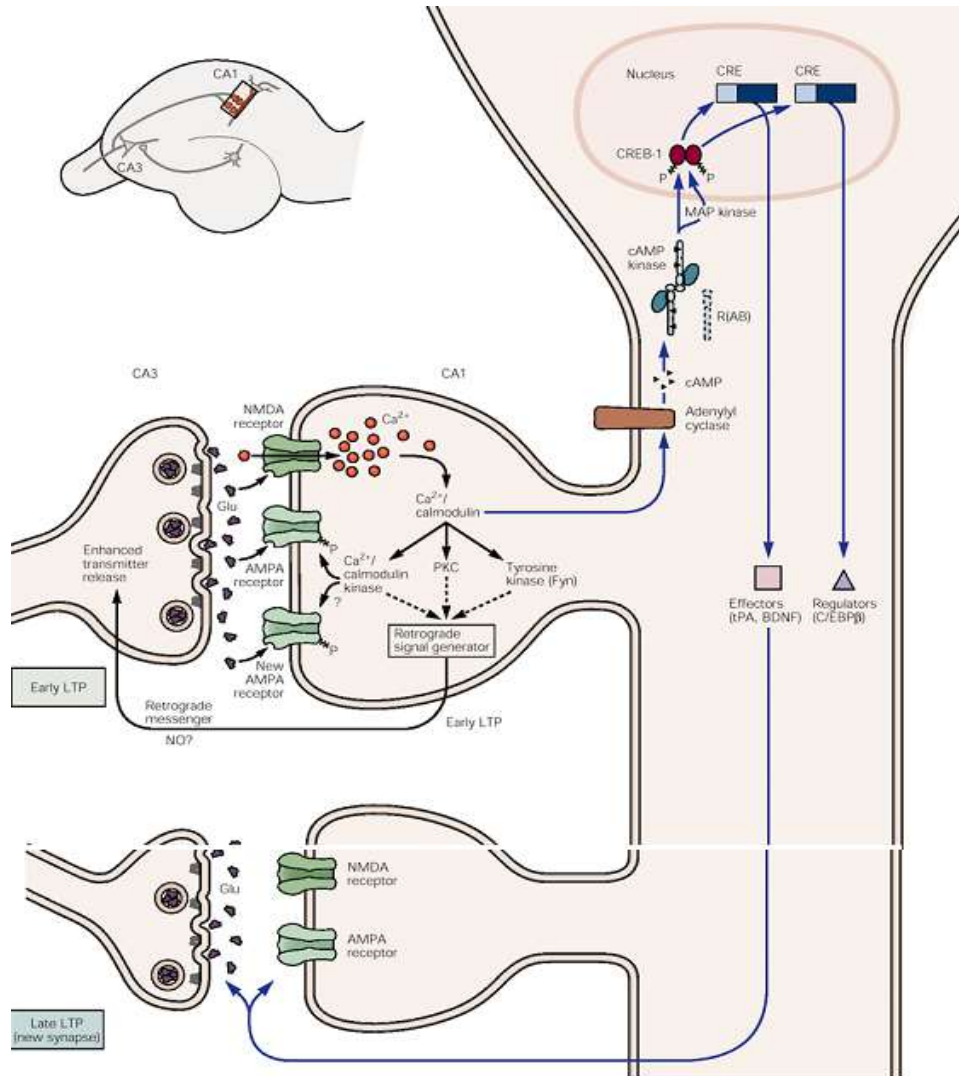


Fig. 5. Un modelo para la fase temprana y tardía de la LTP. Un solo tren de potenciales de acción conduce a LTP temprana (E-LTP) mediante la activación de los receptores NMDA, flujo de Ca^{2+} en la célula postsináptica y un grupo de segundos mensajeros. Con los trenes repetidos de entrada de Ca^{2+} también se recluta a la adenilato ciclasa, la cual activa cAMP dependiente de la proteína quinasa (cAMP quinasa) que permite su translocación al núcleo, donde fosforila la proteína CREB. CREB a su vez activa aquellos objetivos se cree pueden llevar a cambios estructurales. Las mutaciones en los ratones que bloquean PKA o CREB reducen o eliminan la fase tardía de LTP (L-LTP). Adenilato ciclasa puede también ser modulada por aportaciones dopaminérgicas y quizá por otras entradas modificadoras. BDNF = factor neurotrófico derivado del cerebro; C/EBP β = factor de transcripción; P= fosfato; R (AB) dominante negativo de PKA; tPA activador del plasminógeno tisular. Fuente: Kandel et al. (2006). Principles of Neural Science. Mc Graw Hill. pp.1265-66.

1.1.5 Hipocampo.

El Hipocampo es una estructura localizada en la parte media del lóbulo temporal del cerebro. Es llamado formación hipocampal cuando se refiere al hipocampo y al giro dentado (Freund & Buzsáki,1996), y también puede incluir al complejo subicular y la corteza entorrinal (Amaral & Witter,1995).

El hipocampo recibe información sensorial polimodal a través de las vías de entrada desde la corteza entorrinal y goza de una amplia conectividad aferente y eferente con las estructuras corticales y subcorticales frontales (Martin & Clark, 2007). Está organizado en un complejo de tres principales subcapas o subcampos (Freund & Buzsáki, 1996; Rueda et al.,2006; Hartley et al.,2013) además del giro dentado (Martin & Clark, 2007) (Fig. 6).

- El **giro dentado** es considerado la primera capa, además de ser el objetivo de la gran mayoría de las aferencias provenientes de la corteza entorrinal y lleva información sensorial del exterior al interior. Está constituido principalmente por células granulares cuyos axones reciben el nombre de fibras musgosas.
- El **subcampo CA3** representa la segunda capa, las células piramidales de esta región son el principal objetivo de las fibras musgosas (axones de las células granulares). Están conectadas a las células piramidales de la región CA1.
- El **subcampo CA1** es la última subcapa, y las conexiones excitatorias hacia ella son escasas. La principal proyección extrínseca de las células piramidales de CA1 corre hacia el subículum y corteza entorrinal. Subcapa CA1 y subículum son consideradas la mayor estructura eferente del hipocampo a la corteza entorrinal e indirectamente a las áreas neocorticales.
- El **subcampo CA2** es una subcapa menos definida y al parecer carece de características especiales (Freund & Buzsáki,1996). Aunque recientes investigaciones ha relacionado a esta región con la memoria social (Hitti & Siegelbaum, 2014).

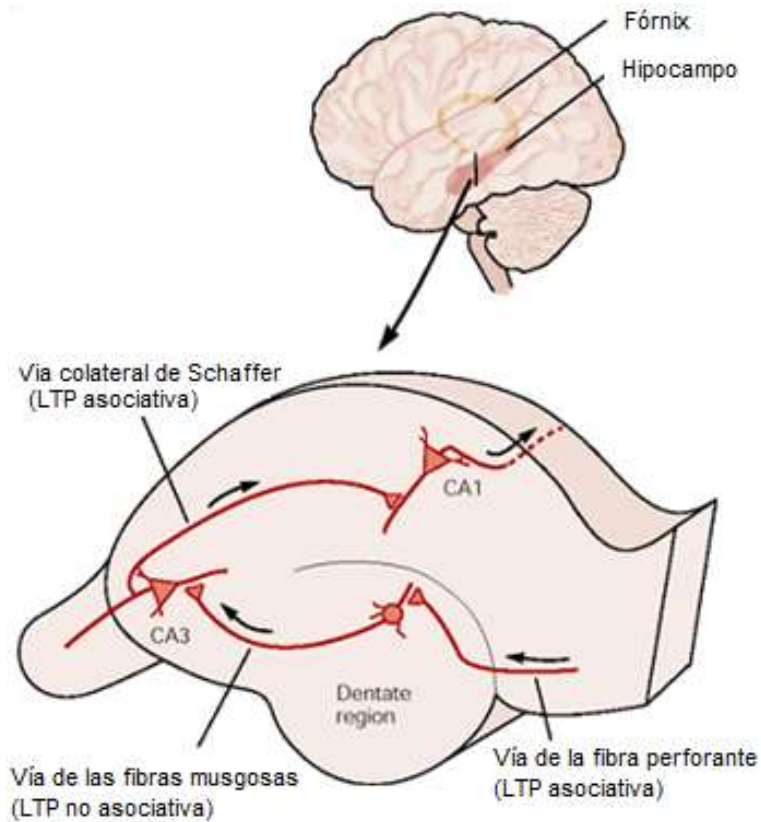


Fig. 6. Las tres principales vías aferentes en el hipocampo. (Flechas indican la dirección del flujo de impulsos). La vía de la fibra perforante desde la corteza entorrinal forma conexiones excitatorias con las células granulares del giro dentado. Los axones de las células granulares forman la vía de las fibras musgosas, que conecta con las células piramidales en el área CA3 del hipocampo. Las células piramidales de la región CA3 proyectan a las células piramidales en la región CA1 por medio de la vía colateral de Schaffer. Potenciación a largo plazo (LTP) es no asociativa en la vía de las fibras musgosas y asociativa en las otras dos vías. Fuente: Kandel et al. (2006). Principles of Neural Science. Mc Graw Hill. p.1258. Modificada 2014.

1.1.6 Descripción de CD38

La primera descripción del marcador de superficie CD38 en humanos, fue hecha por Ellis Reinherz y Stuart Schlossman en 1980 sobre poblaciones linfoides presentes en el timo, utilizando para ello anticuerpos monoclonales (Reinherz et al., 1980). Posteriormente, se ha descrito su distribución en diversos órganos fuera del sistema inmune como: el ojo, próstata, intestino, páncreas, músculo, hueso, riñón (Malavasi et al.,2008; Mehta, Shahid & Malavasi,1996) y el cerebro (Mizuguchi et al.,1995; Yamada et al.,1997; Verderio et al.,2001; Ceni et al., 2003; Jin et al.,2007). CD38 es una glicoproteína de 42 kDa transmembranal (Mehta et al.,1996) cuya estructura está constituida por 300 residuos de aminoácidos pertenecientes a tres dominios: uno corto amino-terminal intracelular, uno transmembranal tipo hélice y otro largo extracelular carboxi –terminal (Mehta et al.,1996; Liu et al.,2005). Debido a su grupo amino terminal interno y el grupo carboxi extracelular, CD38 se clasifica como proteína de membrana tipo II (Mehta et al., 1996) (Fig. 7).

En 1992 se reportó una similitud entre la secuencia de aminoácidos de ADP ribosil ciclasa de *Aplysia californica* y CD38 de linfocitos humanos (States, Walseth & Lee, 1992) y un año más tarde, se confirma que CD38 humano y murino son ectoenzimas (Howard et al.,1993; Zocchi et al.,1993).

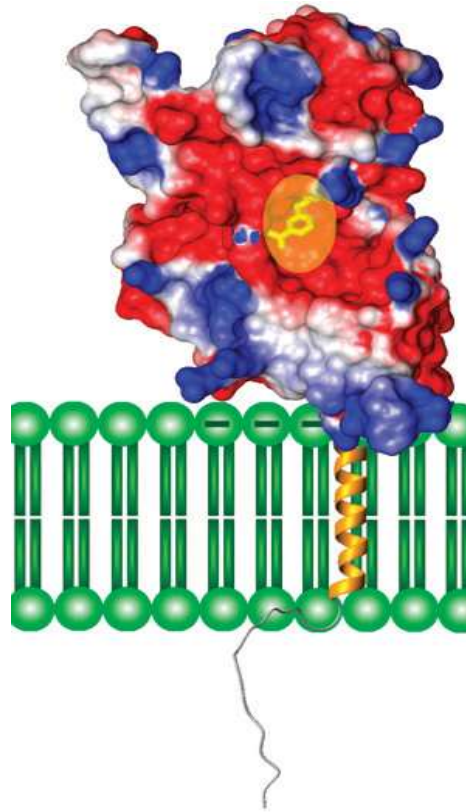


Fig.7 Modelo cristalográfico de CD38. El óvalo amarillo indica el sitio activo de su actividad enzimática. En rojo regiones con carga negativa y en azul las de carga positiva. En verde se muestran los fosfolípidos de membrana. Fuente: Lee, 2006.

1.1.7 Funciones de CD38

Como **receptor** de superficie celular induce proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (Zocchi et al., 1999), regula la adhesión de linfocitos a células endoteliales (Deaglio et al.,1996), induce apoptosis celular así como fosforilación de proteínas (Funaro et al.,1990).

Como **enzima** posee actividad de tres tipos:

1) ADP ribosil ciclasa:

$\text{NAD}^+ \longrightarrow \text{cADPR}$ (Howard et al.,1993; Zocchi et al.,1993) y
 $\text{NADP}^+ + \text{Ácido nicotínico (NA)} \longrightarrow \text{NAADP}^+$ a pH ácido y presencia de NA; sin embargo a pH neutro o ausencia de NA, la reacción es:

$\text{NADP}^+ \longrightarrow \text{ADPR}$ (Zocchi et al.,1993, Aarhus et al.,1995).

2) ADP ribosa cíclica hidrolasa:

$\text{cADPR} \longrightarrow \text{ADPR} + \text{nicotinamida.}$ (Aarhus et al.,1995;
Takasawa et al.,1993)

3) NAD glicohidrolasa:

$\text{NAD} \longrightarrow \text{ADPR} + \text{nicotinamida.}$ (Zocchi et al.,1993; Gelman
et al.,1993).

Además, se ha reportado que cADPR y NAADP⁺ son segundos mensajeros potentes movilizados de Ca²⁺ (Aarhus et al.,1995).

Ambas funciones han sido descritas ampliamente en sistema inmune humano y murino (Harada et al.,1993; Donís, Parkhouse & Santos, 2001; Malavasi et al., 2008, Rodríguez et al.,2008). Además, CD38 tiene una importante participación dentro del estudio de algunos modelos de enfermedad. El análisis de la expresión de CD38 se usa actualmente para el diagnóstico de la leucemia linfocítica y mieloma (Ferrero, Saccucci & Malavasi, 2000), así como monitoreo de infección por HIV (Konopleva, Rissling & Andreeff, 2000).

1.1.8 Ligando de CD38

Se han descrito tres posibles ligandos para CD38:

- Una proteína de 120 kDa predominantemente expresada en células endoteliales (Deaglio et al.,1996).
- Hialuronato (Nishina et al.,1994).
- Una glicoproteína de 130 kDa presente en la superficie de células dendríticas de bazo (Wykes et al.,2004).

1.1.9 Ratón knockout de CD38.

Los ratones homocigotos para CD38 son viables, fértiles y parecen estar libres de defectos manifiestos, sin embargo, la actividad enzimática de CD38 que corresponde a NAD glicohidrolasa en bazo, hígado y cerebro está marcadamente reducida o ausente y se observa una disminución en la respuesta a IgM, IgG1 e IgE (Cockayne et al., 1998). Ratones deficientes de CD38 son incapaces de montar una respuesta inmune innata a patógenos bacterianos tales como *Streptococcus pneumoniae* (Cockayne et al., 1998). Se ha reportado también que los ratones carentes de CD38 poseen alteraciones en las células del páncreas: apoptosis celular anormal y disminución de la masa de células beta- pancreáticas (Johnson et al., 2006).

1.1.10 CD38 y cerebro.

La expresión de CD38 ha sido descrita en distintas estructuras cerebrales: corteza cerebral (en perikaria y membranas de organelos), cerebelo (Yamada et al., 1997), astrocitos cultivados (Verderio et al., 2001), hipotálamo (Jin et al., 2007) e hipocampo (Ceni et al., 2003).

Reportes recientes han demostrado la importancia de CD38 en cerebro murino, donde la ausencia de esta proteína tiene como consecuencia alteraciones en el reconocimiento social y cuidado materno (Jin et al., 2007; Lopatina et al., 2013) todo esto debido a que la actividad enzimática de CD38 es indispensable para la secreción de oxitocina de sus almacenes de hipotálamo y pituitaria, además esa falta de oxitocina se ha relacionado además a desórdenes del espectro autista (Lopatina et al., 2013; Higashida; Munesue et al., 2010; Liu et al., 2008).

Por otra parte, diversas investigaciones se han enfocado a la expresión de CD38 en astrocitos, un sistema de señalización de calcio astrocito-neurona que puede ser activado por el sistema CD38/cADPR, el cual, a través de la movilización de la respuesta a calcio intracelular en astrocitos hipocampales

cultivados, podría ser el responsable del aumento en la liberación de neuromoduladores como glutamato y GABA, donde el primero está relacionado a la memoria y el aprendizaje (Verderio et al., 2001), mismo sistema de señalización glutamatérgico astrocito-neurona, genera una sobreexpresión de CD38 en la membrana plasmática e intracelularmente en los astrocitos corticales cultivados (Bruzzone et al., 2004). Investigaciones relacionadas, en cultivos primarios (13-15 días) de hipocampo de ratones CD38^{+/+} neonatos (1 día), se ha analizado su capacidad de transformar NAD en cADPR y ADPR tanto en células intactas como en células permeabilizadas; la formación de cADPR no pudo ser detectada en ninguna de las dos condiciones mencionadas en cambio actividad en la formación de ADPR a partir de NAD fue considerablemente detectada en ambas condiciones (Ceni et al., 2003); sin embargo, poco se sabe de la función y expresión de CD38 en el hipocampo.

1.1.11 CD38 y neuroinmunología

Los astrocitos regulan la homeostasis del cerebro, al proveer energía y sustratos para la neurotransmisión y participan activamente en la fisiología de la sinapsis tripartita (Reyes, 2014; Perea, Navarrete y Araque, 2009) formada por elementos neuronales y gliales que constituyen la base de la comunicación nerviosa y el procesamiento de la información (Perea y cols., 2009), y es en el hipocampo donde el 60% de las sinapsis son tripartitas (Fellin, Pascual & Haydon, 2006). Además, en astrocitos, células endodiales y glía radial (astroglía), se encuentra presente la proteína fibrilar glial (GFAP de sus siglas en inglés) (Reyes, Bulavina y Pivneva, 2014), la cual pertenece a la familia de las proteínas fibrilares del citoesqueleto, específicamente al sub grupo de neurofilamentos, los cuales se encuentran polimerizados en condiciones fisiológicas, sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer se degeneran en forma característica, los llamados tangles u ovillos de neurofilamentos. (Cardinali, 2007). Por otra

parte, en los astrocitos se ha reportado la implicación de CD38 en trastornos neuroinflamatorios y neurodegenerativos:

- Se ha observado una participación directa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1 de sus siglas en inglés) y el estímulo proinflamatorio inducido por el virus en la regulación de los niveles de CD38 en astrocitos (Mamik et al., 2011). La activación de astrocitos y de tejidos cerebrales humanos con interleucina 1- beta (IL-1 β) y HIV-1 aumentan los niveles de RNA mensajero de CD38 y se observa una colocalización de CD38 con proteínas ácidas fibrilares gliales en áreas de inflamación (Kou et al., 2009).
- Proteína superficial gp120 de la envoltura del HIV (HIV-1gp120) potencia la expresión de CD38 de forma dependiente de la dosis y además incrementa la actividad enzimática de CD38 en astrocitos y astrocitos activados con IL-1 β (Banerjee et al., 2008). Cabe mencionar que IL-1 β es una citocina proinflamatoria producida por células inmunes así como por células gliales, y está involucrada en diversas condiciones fisiopatológicas del sistema nervioso central que implican la activación del receptor NMDA (Schneider et al., 1998; Curran & O'Connor, 2001; Viviani et al., 2003; Marin & Kipnis, 2013).

1.1.12 Test de Laberinto Acuático de Morris.

El test o prueba de Laberinto acuático de Morris fue desarrollado por Richard G. M. Morris en 1981, con el propósito de demostrar que las ratas podían aprender rápidamente a localizar un objeto que nunca habían visto, olfateado o escuchado, el cual se localizaba en una posición fija espacial relativa a señales distales (Morris, 1981). Dicho test consistió básicamente en utilizar una piscina circular de 1.30cm de diámetro y 60cm de alto, con agua a 26 \pm 1°C y localizada en el centro de una habitación de 3 x 4 m,

donde se ubicaba una cámara de circuito cerrado con una lente por encima del centro de la piscina y el equipo de grabación en una habitación adyacente. La habitación tenía una ventana en una pared, una puerta enfrente, estantes en una pared contigua y un armario en el lado opuesto. También se contaba con dos plataformas donde las ratas podían escapar, una blanca plateada que estaba 0.01m por debajo del nivel del agua y otra negra mate que sobresalía 0.01 m sobre el nivel del agua. El procedimiento consistió en tres pasos básicos: un preentrenamiento, una adquisición de escape y la prueba final.

Posteriormente se han hecho variantes al método inicial, dependiendo de la intención y enfoque de cada estudio. (Tabla 2)

Tabla 2. Algunas variantes y adecuaciones a la prueba del laberinto acuático de Morris

No.	Tratamiento Previo (Preentrenamiento)	Tratamiento	Otros	Referencia
1	2 días de entrenamiento no espacial (1 por día). Plataforma sumergida en el centro	4 intentos por día x 7 días. El día 7 también se realiza la prueba final	Además de las pistas a los 4 lados de la cortina, existen figuras.	Stackman, Lora & Williams, 2012.
2	Sin pistas espaciales Plataforma visible en los 4 intentos y variadas locaciones de la plataforma	4 intentos x 7 días	Después de la adquisición, se realizaron dos ensayos de prueba, uno a las 24 horas y uno a los 7 días posteriores a la capacitación, en los cuales no había plataforma	Albarran, Brantley & Smith, 2012
3	No se realiza	3 bloques de 4 intentos (12 intentos x día x 3 días, por ratón). En el entrenamiento la plataforma estuvo fija en una posición	El 4° día ensayo de sondeo sin plataforma nado por 90 segundos. 5° día plataforma visible (movible entre los 4 cuadrantes en 4 intentos).	Kennard & Woodruff, 2012.
4	No se realiza	6 intentos x 4 días. 5°, 6° y 7° día nado sin plataforma.		D'Isa et al., 2011.

5	5 intentos x 1 día. Plataforma visible con una banderita pero movable a través de los 5 intentos en 5 diferentes posiciones (suroeste noroeste, noreste, centro y sureste) así como diferentes posiciones de entrada a la piscina (sur, norte, sur, este y oeste respectivamente).	5 intentos x 3 días. Plataforma sumergida y fija (posición suroeste) y como posiciones de entrada a la piscina (Día 2: oeste, sur,norte,este y sur; día 3: norte, oeste, este, oeste y sur; día 4: norte, este, oeste, sur y norte; día 5:este, sur, oeste, este y norte). En la prueba final la plataforma es removida y el inicio de nado es en la posición norte.	En el preentrenamiento se evalúa la memoria de trabajo. Se deja nadar al ratón 60s si no encuentra la plataforma se coloca sobre ella 20 segundos, si la encuentra se deja sobre ella 5 segundos.	Bromley, Deng & Song, 2011.
6	No se realiza	4 intentos x 4 días consecutivos con plataforma oculta, plataforma fija y salidas aleatorias. 5° día prueba final evaluada en 3 periodos de 30 segundos.	Se deja nadar al ratón 90 s , si no encuentra la plataforma se le conduce a ella y permanece ahí 15 s. 30 min de tiempo entre ensayos diarios.	Fridgeirdottir , Hillered & Clausen, 2014
7	Se sugiere, pero no especifica cómo realizarlo.	Generalmente la prueba de adquisición consiste en 3 a 8 intentos x 3-5 días, donde la plataforma permanece fija.	Algunos detalles en el diseño del test son fundamentalmente importantes en la función específica del hipocampo. Aunque la prueba fue diseñada para ratas (nadadoras) se ha aplicado muy bien para ratones (no nadadores). Los ratones se bajan de la plataforma cuando la encuentran, por ello se sugiere un preentrenamiento	Heikki T, 2012.

Fuente: Elaborada ex profeso para el presente trabajo Domínguez, A. 2014.

La tabla 2 nos muestra diferencias en el procedimiento de la prueba de LAM en cuanto al preentrenamiento, entrenamientos y otros datos extra. En el presente trabajo se utilizó la prueba No. 5, por ser el modelo de estudio de Alzheimer, donde se evalúa el aprendizaje y memoria espacial, así como la memoria de trabajo (que también requiere de un procesamiento espacial).

1.2 Planteamiento del Problema

El hipocampo es la principal región reguladora del aprendizaje y la memoria. Las sinapsis que regulan las funciones de ésta área cerebral son en su mayoría de tipo tripartita, donde los astrocitos poseen un papel modulador del circuito. Se ha descrito que CD38 participa en un mecanismo de señalización de calcio astrocito-neurona que se ha propuesto sea responsable en el aumento en la liberación de glutamato, neurotransmisor que se une a receptores NMDA implicados en el aprendizaje y memoria; sin embargo no existen estudios que muestren la participación de CD38 in vivo en otros procesos complejos como el aprendizaje y la memoria, dada su expresión en células hipocámpales in vitro.

1.3 Justificación

Aprendizaje y memoria son funciones cognitivas primordiales en la supervivencia de las especies. CD38 es una proteína con diferentes funciones, las cuales dependen del órgano o tipo celular en que se exprese. Por tanto, es de interés, identificar la función que realiza CD38 en una región de suma importancia como lo es el hipocampo y sobre todo, si posee un efecto sobre la memoria y el aprendizaje.

1.4 Hipótesis de investigación

Los ratones carentes en la expresión de CD38 presentan deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial.

1.5 Objetivo General

Evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ratones de 3 meses, silvestres (CD38+/+) y deficientes en la expresión de CD38 (CD38/-).

1.5.1 Objetivos Específicos

- A) Analizar la expresión de CD38 en el hipocampo de la cepa de ratones C57BL/6J silvestres (CD38+/+) hembras y machos (♂ y ♀) de 3 meses mediante estudios tipo Western Blot (WB)
- B) Evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en ratones de 3 meses de la cepa C57BL/6J silvestres (CD38+/+) hembras y machos (♂ y ♀), así como en ratones carentes en la expresión de CD38 (CD38/-) hembras y machos (♂ y ♀).

2. CAPÍTULO II

2.1 Material y métodos

2.1.1 Aspectos generales

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurotoxicología de la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana y en el Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud, en la ciudad de México, durante el periodo de Agosto de 2012-Julio 2014.

2.1.2 Tipo de estudio

Experimental

2.1.3 Población de estudio

Ratones silvestres con fondo genético C57BL/6J (CD38+/+) y ratones C57BL/6J carentes en la expresión de CD38 (CD38-/-), todos con edades de 3 meses.

2.1.4 Criterios de inclusión, exclusión y de eliminación

- De inclusión: ratones de las cepas CD38+/+ y CD38-/- con edades de 3 meses.
- De exclusión: ratones de las cepas CD38+/+ y CD38-/- con menos de 3 meses de edad o mayores a 3 meses.
- De eliminación: ratones de las cepas CD38+/+ y CD38-/- con edades de 3 meses que mueran en el transcurso del experimento; así como, ratones que presenten comportamiento de tigmotaxis (comportamiento que consiste en nadar sólo en círculos en los límites de la piscina principalmente, debido a que esta conducta puede significar que el animal posee déficits o alteraciones no relacionadas con la capacidad de aprendizaje espacial y genera datos falsos en las latencias de escape o de permanencia).

2.1.5 Variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
Variables Dependientes	<p>Aprendizaje: proceso a través del cual se adquieren o modifican habilidades, destrezas o conductas como resultado del estudio, experiencia, instrucción, razonamiento y observación.</p> <p>Memoria espacial: tipo de memoria responsable de registrar la información sobre el entorno y la orientación espacial. Es aquella memoria que permite recordar diferentes lugares, así como las relaciones espaciales entre objetos.</p> <p>Memoria de trabajo: es aquella que temporalmente almacena información proveniente de un ambiente que provee pistas para la ejecución de una actividad a corto plazo.</p>	<p>Aprendizaje: menor tiempo transcurrido para que un ratón encuentre la plataforma en el Laberinto acuático de Morris.</p> <p>Memoria espacial: mayor tiempo transcurrido y mayor cantidad de distancia nadada por un ratón, en el cuadrante en donde estuvo localizada la plataforma durante los días de entrenamiento.</p> <p>Memoria de trabajo: tiempo promedio transcurrido en que el ratón alcance la plataforma en los 5 intentos del preentrenamiento.</p>	<p>Segundos</p> <p>Segundos</p> <p>Segundos</p>
Variables independientes	<p>Edad: tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo</p> <p>Sexo: división de género en dos grupos hombre o mujer, hembra o macho.</p> <p>Carencia de CD38: falta de la expresión de la proteína CD38 en una especie.</p>	<p>Edad: meses de vida del ratón desde su nacimiento</p> <p>Sexo: ratón hembra y ratón macho</p> <p>Carencia de CD38: falta de la expresión de la proteína CD38 en ratones que han sido modificados genéticamente.</p>	<p>Meses</p> <p>Macho y Hembra</p> <p>Presente y ausente</p>

2.1.6 Procedimiento de recopilación de datos

Para llevar a cabo la obtención de las cepas de ratones CD38^{+/+} y CD38^{-/-}, se gestionó con el Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV la donación de pie de cría. Posteriormente el crecimiento y adaptación de las cepas de ratones CD38^{+/+} y CD38^{-/-}, se realizó en el Laboratorio de Neurotoxicología de la Universidad Veracruzana. Para la realización de los métodos del estudio se contó con la participación de 19 ratones ♂ y 14 ratones ♀ de ambas cepas (CD38^{+/+} y CD38^{-/-}), todos de 3 meses de edad provenientes de 9 camadas. Con la finalidad de

corroborar el fenotipo de las dos cepas, dos animales ♂ y dos ♀ se sacrificaron para la realización de técnicas de citometría de flujo y ensayos tipo WB en muestras de bazo. Después un par de animales de las dos cepas ♂ y ♀ se sacrificaron para llevar a cabo los ensayos tipo WB necesarios para identificar la presencia o ausencia de CD38 en el hipocampo. Posteriormente se procedió a evaluar el aprendizaje y la memoria espacial en 15 ratones ♂CD38+/+ y CD38-/- y 10 ratones ♀ CD38+/+ y CD38-/-.

2.1.7 Procesamiento estadístico

Con los programas Sigma Stat y Sigma Plot se realizó un análisis de Mann-Whitney para datos no paramétricos y un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, donde un valor de p menor a 0.05 se consideró como significativo.

2.1.8 Métodos

2.1.8.1 Tinción por Citometría de flujo

Para este propósito, dos ratones CD38+/+ (♂ y ♀.) y dos ratones CD38-/- (♂ y ♀.) fueron sacrificados por decapitación. Posteriormente se obtuvo el bazo y se colocó en una caja Petri con 5ml de PBS (Solución buffer de fosfatos 1X). El bazo se disgregó con ayuda de una malla de acero inoxidable y un émbolo de jeringa. A continuación se recogieron las células en un tubo y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en PBS; para eliminar a los eritrocitos se añadieron 5 ml de solución de cloruro de amonio al 0.85% (NH₄Cl 150mM, 10mM de bicarbonato de potasio y 0.1mM de EDTA) por 3-4 minutos y se lavó 2 veces con PBS y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en 3 ml de PBS. Para medir viabilidad celular se realizó una dilución 1:10 de las células con azul tripano a 0.4%, colocando 10

μl de la suspensión celular más 90 μl de azul tripano. Posteriormente, se cargó una cámara de Neubauer con 10 μl de la dilución. Finalmente se contaron las células en el área para glóbulos blancos (4 esquinas) en un microscopio con objetivo de 40x, usando la siguiente relación: células/ml = (# total de células/4)(dilución=10)(factor=10000). Para la tinción de moléculas de superficie se utilizaron un millón de células de bazo suspendidas en un volumen no mayor a 100 μl de PBS conteniendo BSA al 1% y NaN₃ al 0.01% (PBA). A continuación, las células se marcaron con los anticuerpos anti-CD38-PE y B220-APC (Pharmingen/BD Biosciences, San José, CA) y fueron incubadas por 15 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente, posteriormente lavadas con PBA y fijadas con solución FixFacs (PBA y formaldehído al 1%). Los datos fueron adquiridos en el citómetro Cyan (BD Biosciences) y analizados con el uso del programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

2.1.8.2 Ensayos tipo “Western Blot”

Se sacrificaron un par de animales representativos de cada cepa por medio de dislocación cervical, se obtuvieron bazo e hipocampos. El tejido hipocampal y tejido de bazo se maceraron y posteriormente se lisaron con un buffer que contenía 10 mM de Tris/HCl (pH 7.3) (Merck, Darmstadt, Germany), 2 mM de Na₃VO₄ (Sigma), 0.4 mM de EDTA (Baker), 10 mM de NaF (Sigma), 1 mM de Fenilmetanesulfonil fluoro (Sigma), 2 μg/mL de Aprotinina (Sigma), 2 μg/mL de Leupeptina (Roche, Indianápolis, IN) y Nonidet P-40 al 1% (v/v) (Sigma). Cantidades equivalentes de proteína se cargaron en un gel al 10% (SDS-PAGE). Después de la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, éstas se incubaron con anticuerpos anti-CD38. Las membranas se marcaron con anticuerpos anti-IgG-HRP de ratón (Zymed). Finalmente, para la detección de las

proteínas por quimioluminiscencia se utilizó un kit ECL-Plus (Amersham/Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2.1.8.3 Laberinto Acuático de Morris

1. Preparación del equipo.

Para tal propósito se utilizó una piscina circular blanca de 150 cm de diámetro y 60 cm de altura. Se acondicionó la habitación con cortinas color claro alrededor de la piscina lo que impidió que el ratón observara al experimentador durante las sesiones de nado. Sobre las cortinas y a la altura del límite de la piscina se colocaron las señales de alto contraste espacial (un cuadro, un círculo, un rombo y una estrella de color blanco con diagonales negras dentro de la imagen). Se colocó una plataforma de PVC de 11cm de diámetro dentro de la piscina. A continuación, se llenó con agua la alberca, hasta por debajo de un centímetro de la superficie de la plataforma y se calentó con resistencias eléctricas hasta obtener la temperatura de 22°C.

2. Preparación del software.

Para poder registrar en video y el tiempo de nado del ratón, se designaron las zonas de interés en el programa OASPADVID (zona de la piscina y zona del cuadrante donde se colocó la plataforma durante el test) y se guardó la información. Posteriormente se registró en el programa un tiempo de 60 s. máximo de grabación en video para cada ensayo, cuando el ratón encontró la plataforma antes de este tiempo, manualmente se detuvo el tiempo de grabación y de igual forma, manualmente se inició la grabación del video del siguiente ratón, previo a guardar el video realizado en una carpeta creada en el disco duro de la computadora (una carpeta por cada día del test y por ratón).

3. Preparación de los animales.

Con la finalidad de identificar a cada ratón de cada especie y dar seguimiento a su evolución dentro del test, cada uno fue marcado con

un perforador de orejas utilizando un código de identificación personal, y para facilitar su identificación en la caja en el momento de realizar cada intento de nado, también se marcaron con plumón indeleble negro un día antes de iniciar el test y al finalizar cada día después de la sesión de nado.

4. Preparación del experimentador.

Durante todo el periodo de tiempo que duró el test (6 días) el experimentador (que debe ser el mismo de principio a fin) no utilizó perfumes, usó guantes en todo momento y no cambió de desodorante, de jabón o shampoo cuando se bañó, con la finalidad de que el olfato no fuera un factor que pudiera alterar a los ratones y con ello los resultados.

5. *Día 1: Plataforma visible (Pre entrenamiento)*

Para dar inicio al test, se llenó con agua corriente la plataforma, se calentó con resistencias hasta la temperatura de 22°C y se colocó una pequeña bandera hecha con una pipeta y un trozo de papel morado para incrementar la visibilidad de la plataforma. A continuación, se transfirió uno por uno los grupos de ratones (♂ CD38+/, ♂ CD38-/, ♀ CD38+/, y CD38-/- ♀) desde el área de alojamiento al área de registro de conducta en donde se encontraba la piscina. Se mantuvo al ratón en una caja desde donde no pudo ver la piscina o las pistas espaciales. Posteriormente, para iniciar la prueba con el nado de los ratones, se tomó al ratón número uno por la base de la cola y se apoyó al ratón en la mano mientras se transportó al cuadrante de inicio marcado para ese día. Después se levantó al ratón por la cola y gentilmente se colocó en el agua mirando hacia el borde de la piscina. Rápidamente se le dejó nadar libremente, mientras el experimentador se ocultó tras la cortina. Dos auxiliares estuvieron a cargo del registro del video en la computadora (que se encontró fuera del cuarto con la piscina). Cuando el ratón encontró la plataforma en menos de 60s, se le permitió permanecer en la plataforma otros 10 segundos, y después se regresó

a su caja (durante el trayecto se secó al ratón con un paño absorbente para evitar hipotermia). Este procedimiento se repitió con cada ratón en cada intento. En total fueron 5 intentos y cada intento subsecuente comenzó con una localización distinta de la plataforma (ver Tabla 3 y Fig. 8) y un punto de inicio de nado diferente (ver tabla 3 y Fig. 8). En preparación para el siguiente día, se removió la bandera de la plataforma, se adicionó agua a la piscina hasta cubrir la plataforma 1 cm por debajo de la superficie y se adicionó colorante para alimentos blanco para hacer opaca el agua de la piscina. En esta etapa una menor latencia de escape se interpreta como mayor memoria de trabajo.

6. *Día 2-5: Plataforma oculta (D1-D4)*

En estos 4 días del test, se calentó el agua de la piscina a 22°C de ser necesario. La plataforma se colocó en una posición fija en la posición suroeste (SO) y se repitieron los pasos del día 1, desde colocar a los grupos de ratones uno por uno (♂ CD38+/, ♂ CD38-/, ♀ CD38+/, y CD38-/- ♀) en el cuarto de la piscina y se siguieron las instrucciones de inicio de nado de los ratones en cada intento (5 intentos en total por ratón) como se estableció en la tabla 3 (ver Fig.8) Se consideraron las mismas especificaciones de transportación y secado de los ratones como se indicó en el día 1. En esta fase, una menor latencia de escape se interpreta como un mayor aprendizaje.

7. *Día 6: Ensayo de exploración o prueba final.*

Para la realización de la parte final del test, se removió la plataforma de la piscina y se dejó nadar a cada ratón libremente durante 60 segundos iniciando el nado desde la posición norte (N) (ver Tabla 3 y Fig. 8) y pasados los 60 segundos se retiró al ratón de la piscina (se transportó y se secó al ratón como se indicó en el día 1). En esta fase, un mayor tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo (C1) se interpreta como memoria espacial.

Tabla 3. Protocolo del test de Laberinto Acuático de Morris.

	Día 1		Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
	Localización de la plataforma	Dirección Inicial	Localización de la plataforma: SO (suroeste). Iniciar la prueba como sigue:				No plataforma
Intento 1	SO	S	O	N	N	E	N
Intento 2	NO	N	S	O	E	S	
Intento 3	NE	S	N	E	W	W	
Intento 4	Centro	E	E	O	S	E	
Intento 5	SE	O	S	S	N	N	

Fuente: Bromley, Deng & Song. 2011. Modificado 2014.

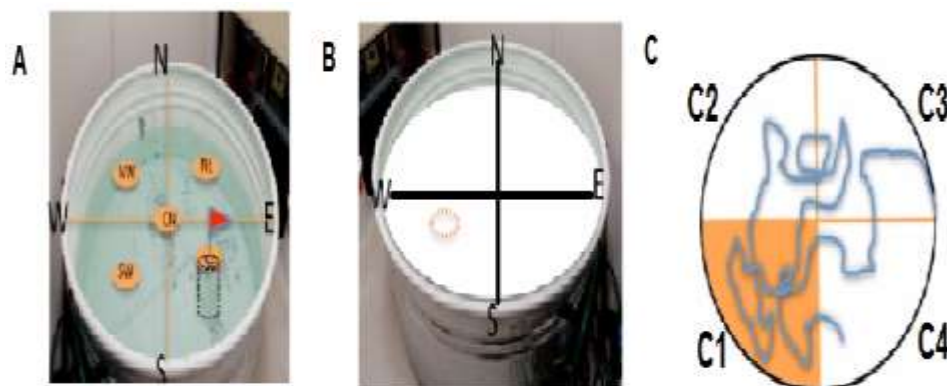


Fig. 8. Test de LAM. A) Sesión 1, preentrenamiento. Se muestran los 4 cuadrantes en los que se divide la piscina y las 5 zonas en las que la plataforma es movida durante la prueba B) Latencia de escape, 4 días de entrenamiento (D1-D4). Se muestra la posición sumergida de la plataforma en el cuadrante suroeste durante los 4 días de entrenamiento. C) Sesión 6, día de la prueba final. Se muestra ejemplo de recorrido del ratón durante la sesión. La zona en color naranja indica el cuadrante donde estuvo localizada la plataforma de escape durante el entrenamiento, y que para esta sesión se ha removido. Fuente: Bromley, Deng & Song. 2011. Modificada 2014.

3. CAPÍTULO III

Resultados

Caracterización de la cepas de ratones CD38+/+ y CD38-/-

En el presente estudio se utilizaron dos cepas de ratones: CD38+/+ y CD38-/- y para corroborar su fenotipo se realizaron pruebas de citometría de flujo (Ver figura 9) y WB (Ver figura 10)

CITOMETRÍA DE FLUJO

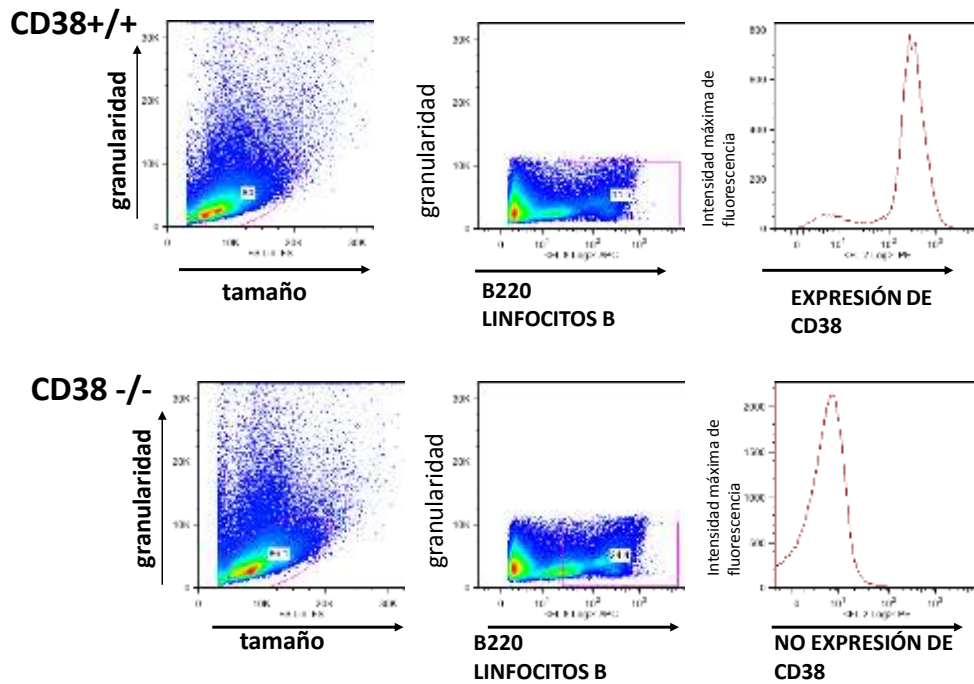


Fig. 9. Expresión de CD38 en los ratones CD38+/+. Células de Bazo de ratones CD38+/+ y CD38-/- fueron teñidos con anti-CD38 y anti-B220. Posteriormente, fueron analizados de acuerdo a su tamaño y granularidad celular. La subpoblación de linfocitos B (B220+) fue seleccionada. El histograma muestra la intensidad media de fluorescencia en la subpoblación de linfocitos B que representa la expresión de CD38.

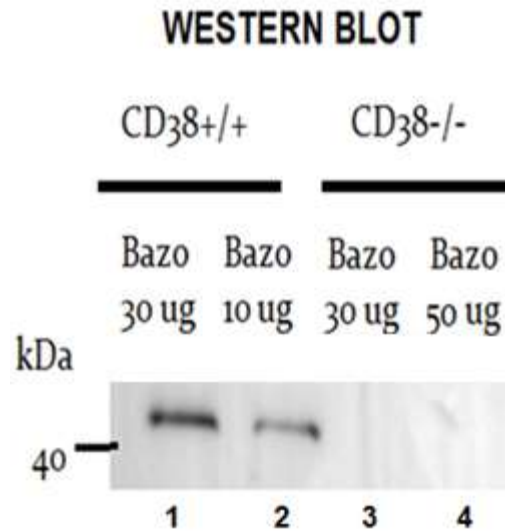


Fig. 10. Expresión de CD38 en bazo de la cepa de ratones CD38^{+/+} En los carriles 1 y 2 podemos notar la expresión de la proteína en el bazo en diferentes cantidades de carga; en los carriles 3 y 4 se observa la no expresión de CD38 en el bazo de ratones CD38^{-/-}.

Los resultados de citometría de flujo y WB mostraron que las cepas de ratones utilizados para llevar a cabo el test de LAM poseen un fenotipo adecuado CD38^{+/+} y CD38^{-/-}.

Expresión de CD38 en hipocampo de ratones CD38+/+.

Se evaluó la expresión de CD38 en el hipocampo de ratones CD38+/+ hembras y machos de 3 meses de edad. Se observó una expresión significativa de CD38 en el hipocampo de los ratones macho y hembra (Fig. 12). Interessantemente, la expresión de CD38 es diferencial debido a que en machos se observó una mayor expresión en el hipocampo derecho con respecto al izquierdo. Para el caso de las hembras, la expresión de CD38 se invirtió, el hipocampo derecho tuvo una menor expresión con respecto al hipocampo izquierdo (Fig. 11).

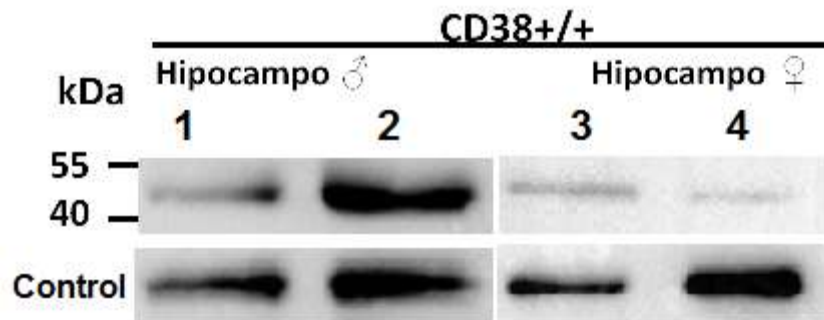


Fig. 11. Análisis de WB de CD38 en hipocampo de ratones CD38+/+. Expresión de CD38 en lado izquierdo (carril 1) y lado derecho (carril 2) de hipocampo de CD38+/+ ♂ de 3 meses. Expresión de CD38 en porción izquierda (carril 3) y derecha (carril 4) de hipocampo de CD38 +/+ ♀ de 3 meses. En todos los ensayos se muestra el control de carga de β -actina.

Para estudiar el efecto de CD38 en el aprendizaje y la memoria espacial en ratones CD38^{-/-} y CD38^{+/+} ♂ y ♀ de 3 meses, se analizó su comportamiento a través del test de LAM, después de lo cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Déficit en la memoria de trabajo de ratones hembras CD38^{-/-} de 3 meses.

Preentrenamiento (Fig. 12A) donde se espera que el ratón tenga cortos tiempos de latencia para encontrar la plataforma lo que se interpreta como mayor memoria de trabajo. Hembras CD38^{-/-} requieren mayor tiempo para alcanzar la plataforma visible que las hembras CD38^{+/+} así como machos CD38^{-/-} con respecto a las hembras CD38^{-/-} (Mann-Whitney * $p=0.006$). Ninguno de los roedores evaluados presentaron tigmotaxis.

Diferencia entre ratones machos CD38^{-/-} y CD38^{+/+} en el entrenamiento de aprendizaje.

Durante la fase de adquisición del aprendizaje en machos y hembras, en los 4 días de entrenamiento (D1-D4) donde la plataforma permanece fija en un cuadrante y se esperan tiempos de latencia que se reducen a través de los días, lo que se interpreta como aprendizaje (Fig. 12 B y 12C respectivamente), se presentó una diferencia significativa entre los ratones machos CD38^{+/+} y CD38^{-/-} a través de los días de entrenamiento (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, [(F=2,119)=9.331 y # $p<0.001$], para D3 * $p= 0.026$). En el caso de los resultados en las hembras, en los días de entrenamiento (D1-D4) también se obtuvo diferencia significativa entre días de entrenamiento entre las dos cepas (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, [F(2,79)=19.803] # $p< 0.001$).

Análisis entre género entre ratones CD38^{+/+} y CD38^{-/-} no muestra diferencia significativa.

Deficiencia en la memoria espacial en ratones machos CD38^{-/-}, hembras CD38^{-/-} y CD38^{+/+}.

En la última sesión o prueba final (Fig. 12D) ya no existió plataforma de escape y se espera que existan valores de tiempo altos de permanencia en C1, interpretándose como memoria espacial. Los datos mostraron diferencia significativa en el tiempo de permanencia en C1 entre machos de ambas cepas, pasando menor tiempo en C1 los machos CD38^{-/-} (ANOVA de dos vías de medidas repetidas [F=(2,159)=41.379] *p<0.001). De manera interesante, en los ratones machos CD38^{-/-} no hubo diferencia significativa en el tiempo de permanencia entre C1 y C2. Con respecto a los resultados en las hembras, los datos mostraron que no hubo diferencia significativa en los tiempos de permanencia entre C1 entre las hembras CD38^{-/-} y las hembras CD38^{+/+}. Y de igual forma que los machos CD38^{-/-}, las hembras de ambas cepas pasaron los mismos tiempos en C1 y C2, denotando con ello una desorientación espacial. Análisis de género entre ratones CD38^{+/+} y CD38^{-/-} no muestra diferencia significativa.

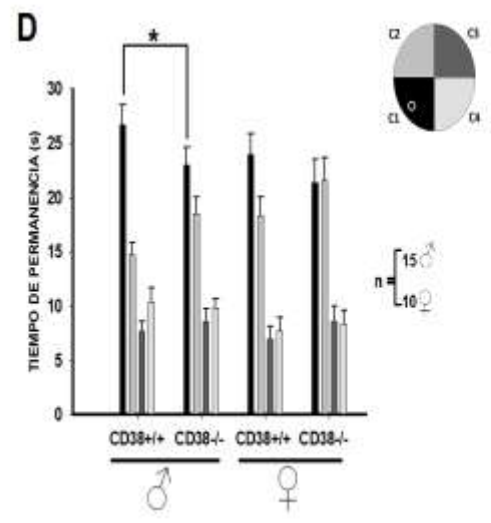
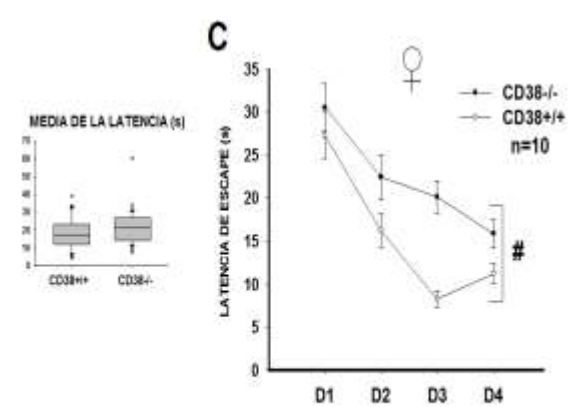
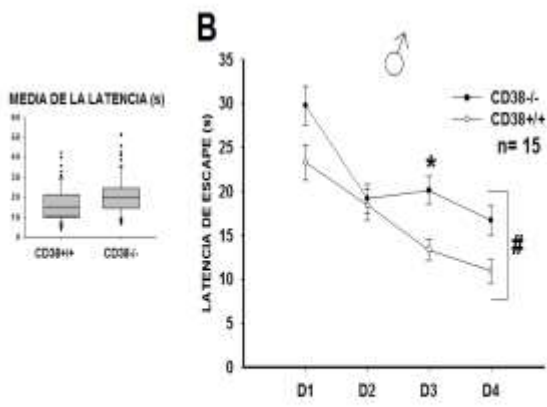
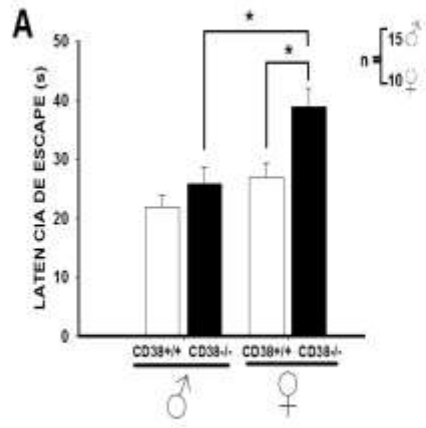


Fig. 12. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial en ratones CD38+/+ y CD38-/- de 3 meses mediante el test de LAM. (A) Pre entrenamiento. Las barras blancas representan las latencias de escape de la plataforma visible de los ratones CD38+/+ y las barras negras representan las latencias de escape de los ratones CD38-/. De izquierda a derecha, la primera y segunda barras representan a los grupos de animales machos y la tercera y cuarta barras a los grupos de hembras (Mann-Whitney *p=0.005). **(B) y (C)** Fase de adquisición de los machos y las hembras respectivamente. Gráfica con círculo negro representan a CD38-/- y con círculo blanco a CD38+/+, existe diferencia significativa entre los días de entrenamiento para los machos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, [(F=2,119)=9.331 y p<0.001], *p=0.026) y para las hembras (ANOVA de dos vías de medidas repetidas, [F(2,79)=19.803] p< 0.001). **(D)** Prueba final. El círculo en distintos tonos de grises representa los 4 cuadrantes de la piscina, el tono más oscuro simboliza el cuadrante donde se ubicó la plataforma durante los días de entrenamiento (C1). De izquierda a derecha: Los dos primeros conjuntos de barras representan a los machos CD38+/+ y CD38-/- respectivamente, y el tercer y cuarto grupo de barras a los grupos de hembras CD38+/+ y CD38-/. Diferencia significativa entre machos entre cuadrantes (ANOVA de dos vías de medias repetidas [F=(2,159)=41.379] p<0.001, para C1 *p<0.005).

4. CAPÍTULO IV

Discusión y conclusiones

4.1 Discusión

El aprendizaje y la memoria son propiedades cognitivas que favorecen la adaptación de las especies a su medio (Rueda et al., 2006). La memoria comenzó a estudiarse al presentarse los primeros casos de amnesia (Scoville & Milner, 1957; Squire, 2004), encontrándose que no es un proceso único, existe una extensa red de interconexiones entre diversas zonas cerebrales que soportan a los distintos tipos de memoria (Constantinidis & Procyk, 2004; Lynch, 2004; Kandel, 2009; Brodziak et al., 2013), sin embargo, se ha reportado que es el hipocampo la región cerebral en donde se lleva a cabo el almacenamiento, consolidación y recuperación de los recuerdos (Eichenbaum, 1999; Rueda et al., 2006; Martin & Clark, 2007) siendo la corteza prefrontal la encargada de almacenarlos a corto o largo plazo (Morgado, 2005; Touzan, Puthanveetil & Kandel, 2007). Además, el hipocampo posee una función importante en la ubicación espacial, siendo éste un componente fundamental de la memoria declarativa (Martin & Clark, 2007; Hartley, 2013). La atrofia en hipocampo es a menudo una característica temprana en la progresión de la enfermedad de Alzheimer y los pacientes con daño en hipocampo generalmente poseen dificultad en la formación de nuevos recuerdos (Hartley, 2013).

La molécula CD38 se expresa en diversos tipos celulares y en cada uno posee funciones definidas (Malavasi et al., 2008; Mehta et al., 1996). En reportes recientes se describe la presencia de CD38 en cerebro (Mizuguchi et al., 1995; Yamada et al., 1997; Verderio et al., 2001; Jin et al., 2007), en la región del hipocampo (Ceni et al., 2003), CD38 y su relación con el comportamiento y desórdenes del espectro autista (Lopatina et al., 2013; Higashida, 2011; Munesue et al., 2010; Liu et al., 2008), con la expresión de

los receptores NMDA así como a estados neuroinflamatorios y neurodegenerativos (Cardinalli, 2007; Barnejee, 2008; Kou et al., 2009; Mamik et al., 2011; Reyes, 2014). Sin embargo, no existen estudios que muestren la participación de CD38 en los procesos del aprendizaje y la memoria dada su expresión en células de hipocampo. De tal forma, en el presente trabajo el objetivo principal fue el conocer la participación de CD38 en el aprendizaje y la memoria espacial en ratones de 3 meses. De manera interesante, uno de los primeros hallazgos consistió en la expresión diferencial de CD38 debido a que en machos se observó una expresión mayor en el hipocampo derecho con respecto al izquierdo; para el caso de las hembras, la expresión de CD38 se invirtió, el hipocampo derecho expresó mayor cantidad de CD38 con respecto al hipocampo izquierdo (Fig. 11). Adicionalmente, en general, la expresión de CD38 en hipocampo de los machos es mayor que en el hipocampo de las hembras (Fig. 11). Se ha reportado que existe una actividad bilateral cerebral (Glover & Dixon, 2001; Tulving, 2002; Foster, 2003) por lo que estos datos podrían sugerir que la actividad de CD38 es diferencial en hipocampo debido a una bilateralidad anatómico funcional. En este sentido, vale la pena mencionar que estudios relacionados a las diferencias cognitivas entre sexos, mencionan que actualmente existe cierto consenso sobre el hecho de que esas diferencias se pueden encontrar en ciertas habilidades, particularmente las espaciales pero no en la inteligencia en general (Echavarri, Godoy y Olaz, 2007). Así, en el caso de los seres humanos, hombres y mujeres exhiben un rendimiento diferencial en varios test cognitivos, incluyendo test de dominios visual-espacial y verbal (Bell, Willson, Wilman, Dave & Silverstone, 2006). Se han observado dimorfismos sexuales en test cognitivos de habilidad espacial (rotación mental y recepción espacial), donde los hombres superan a las mujeres y test de habilidad verbal (particularmente fluidez verbal) mujeres superan a los hombres (Wegesin, 1998); particularmente, estas investigaciones han sido observadas usando tomografías de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) y con

tomografías computarizada por emisión de fotones (SPECT, por sus siglas en inglés) (Bell et al., 2006). Activaciones específicas de género en el cerebro han sido observadas en regiones insulares y talámicas, cinguladas, frontales (Lee et al., 2002), parietales (Weiss et al., 2002) así como lateralización entre los dos hemisferios (Lee et al., 2002; Speak et al., 2000). Otros estudios sugieren que las mujeres poseen una gran lateralización del hemisferio derecho durante los test de memoria de trabajo (Speak et al., 2000) y en los hombres esa lateralización se dirige hacia el hemisferio izquierdo durante test que requieren un juicio de un objeto entero a partir de sus partes (Georgopoulos et al., 2001). Reportes semejantes muestran que las capacidades lingüísticas y espaciales son más asimétricas en el hombre, dependiendo el lenguaje del hemisferio izquierdo y el reconocimiento espacial del lado derecho; en las mujeres, ambas capacidades están distribuidas más simétricamente entre ambos hemisferios, su hemisferio derecho está menos especializado en algunas funciones (Gil y cols., 2003). Aunado a todo ello, la relación entre una asimetría funcional, anatómica y neuroquímica no está clara, aunque sí existen reportes de casos puntuales (Morago, 2014) como son la asimétrica producción de óxido nítrico y la expresión del gen de óxido nítrico sintasa inducible que se hallan elevadas significativamente en cultivos de células gliales corticales provenientes del hemisferio derecho, en comparación con cultivos del lado izquierdo (Xin, Su, Wang, Zeng & Li, 2012), asimetría en la expresión de los genes del factor neurotrófico derivado del cerebro (por sus siglas en inglés BDNF) y del receptor tirosina cinasa de neurotrofina tipo 3 (por sus siglas en inglés NTRK3) en corteza frontoparietal en ratas resistentes al estrés en un modelo animal de depresión, donde BDNF y NTRK3 fueron expresados significativamente en más bajos niveles en el hemisferio derecho de las ratas anhedónicas comparadas con las ratas resistentes al estrés (Farhang et al, 2014), la presencia de lateralización izquierda en el globo pálido de dopamina y colin-acetil-transferasa (Glick, Ross & Hough, 1982), mayor concentración de receptores para la dopamina

tipo D2 en el núcleo estriado (Larisch et al., 1998) observándose una diferencia entre hemisferios de un 15% (Zimmemberg, Glick & Jerussi, 1974); así como también ha sido observada una disociación izquierda-derecha en el proceso de memoria hipocampal en ratones en la cual el silenciamiento del área CA3 del hipocampo izquierdo daña la memoria asociativa de largo plazo, mientras que la misma manipulación en el hipocampo derecho no produce el mismo efecto (Shipton et al, 2014).

En el hemisferio derecho de las hembras la expresión de CD38+/+ es escasa (hemisferio especializado en memoria de trabajo) (Fig. 11), sin embargo, esa cantidad en expresión sugiere la diferencia que existe en la memoria de trabajo entre las hembras silvestres y las carentes de CD38 (Fig. 12A), y además esta diferencia en la memoria de trabajo también es significativa entre género de los ratones CD38-/- (Fig. 12A). En el hemisferio derecho de los machos silvestres (especializado en reconocimiento espacial) la expresión de CD38 fue mayor que en el hemisferio izquierdo (Fig. 11) y ello implica una mayor permanencia en C1 en la prueba final, lo que no ocurre en el ratón macho CD38-/-, mostrando una deficiencia en la memoria espacial (Fig. 12D). Las hembras CD38+/+ presentaron una menor expresión de CD38 en el hipocampo derecho (Fig.11) que sugiere su falta de memoria espacial en la prueba final (Fig.12D), y que además se compara a la deficiencia en esta prueba presentada por las hembras CD38-/- (Fig. 12D). Durante la fase de entrenamiento, machos y hembras CD38-/- presentan diferencia significativa con respecto a sus congéneres silvestres, haciéndose más lento su aprendizaje (Fig.12B y 12C). En conjunto, lo anteriormente dicho indica que los ratones machos y hembras CD38-/- aprenden la estrategia en el entrenamiento más lentamente que los ratones machos y hembras CD38+/+, pero no memorizan la ubicación de la plataforma.

Por otro lado, otras investigaciones sobre LAM en ratones CD38^{-/-} utilizando un protocolo de LAM distinto al usado en este trabajo mostraron tendencias de un mejor rendimiento los ratones CD38^{-/-} sobre los CD38^{+/+} (Young, 2007), sin embargo los resultados obtenidos contrastan con ellos, ya que los análisis de los datos demuestran deficiencias significativas en la memoria de trabajo y aprendizaje en los animales CD38^{-/-} de 3 meses (Fig. 13).

En resumen, nuestros resultados coinciden con investigaciones relacionadas al campo, siendo este trabajo además, pionero en la investigación de la expresión diferencial hemisférica y de género de CD38 en hipocampo y su relación con el aprendizaje y la memoria espacial.

4.2 Conclusiones

- Se comprueba la hipótesis de trabajo: Los ratones carentes en la expresión de CD38 presentan deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial.
- CD38 es una molécula implicada en el aprendizaje y la memoria espacial en ratones machos y hembras de 3 meses de edad.
- La expresión de CD38 en hipocampo presenta dimorfismo sexual y asimetría lateral hemisférica, en ratones CD38+/+ de 3 meses de edad.

4.3 Recomendaciones

Aun cuando se ha determinado que CD38 es importante para la adquisición de la memoria y el aprendizaje espacial en un modelo murino, es necesario elucidar la forma en cómo ésta molécula participa en los mecanismos de la formación, consolidación y recuperación de la memoria y su interacción con los sustratos neuroquímicos de la formación de ésta. A pesar de que se ha sugerido su actividad enzimática como generador de potentes movilizados de calcio, y estos a su vez movilizados de neurotransmisores capaces de actuar en la formación de la memoria como el glutamato, se desconoce las vías por medio de las cuales esto es posible. El determinar las vías de señalización que se activan en el modelo murino CD38^{-/-} al ser evaluado en test de memoria y aprendizaje permitiría conocer los mecanismos por medio de los cuales CD38 participa de esos procesos.

Otros aspectos importantes a investigar, serían la relación entre CD38 y el género así como la expresión anatómica diferencial en hipocampo.

4.4 Limitaciones

Entre las limitaciones que se presentaron en la realización del presente estudio, se puede mencionar que la cantidad de ratones hembras para la realización de los experimentos, estuvo limitada debido al crecimiento natural de las mismas (nacieron menos hembras que machos). Otro punto a mencionar fue el tiempo, considerando que las diferencias encontradas en los ratones de 3 meses, podrían haberse seguido a 6, 9, 12, 15 meses etc., de acuerdo el periodo de vida al que pudieran llegar los animales, para evaluar si CD38 es igualmente importante a edades adultas mayores como lo es en un adulto joven.

4.5 Consideraciones éticas

La manipulación de los animales utilizados para la presente investigación se realizó de acuerdo a lo establecido en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el manejo de animales de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Aahus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F., Lee H.C.(1995). ADP-ribose cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem*, 270(51),30327-33.

Abel, T. et al.(1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long term memory. *Cell*.88, 615-26

Albarran, R.G., Brantley, A.F. & Smith, R.G. (2012). Growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) knockout mice exhibit improved spatial memory and deficits in contextual memory. *Behav Brain Res*. 15;232(1), 13-9.

Amaral, D.G. & Witter, M.P. (1995). Hippocampal formation. In the rat nervous system, 2nd ed (Paxinos G ed). New York, Academic Press pp 443-494.

Banerjee, S, Walseth, T.F., Borgmann, K., Wu, L., Bidasee, K.R. et al. (2008).CD38/cyclic ADP-ribose regulates astrocyte calcium signaling: implications for neuroinflammation and HIV-1 associated dementia. *J Neuroimmune Pharmacol*. 3, 154-64.

Bell, E.C., Willson, M.C., Wilman, A.H., Dave, S., Silverstone P.H. (2006). Males and females differ in brain activation during cognitive tasks. *Neuroimage*. 30(2), 529-38.

Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361(6407), 31-9.

Brodziak, A. et al. (2013) Clinical significance of knowledge about the structure, function and impairments of working memory. *Med Sci Monit.* 19, 327-338.

Bromley, K., Deng, Y. & Song, W. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp.* 20;(53).

Bruzzone, S., Verderio, C., Schenk. U., Fedele, E., Zocchi, E et al. (2004) Glutamate-mediated overexpression of CD38 in astrocytes cultured with neurons. *J Neurochem.* 89(1), 264-72.

Cardinalli, D. P. 2007 *Neurociencia aplicada*. Ed. Panamericana.p.28.

Ceni, C., Pochon, N., Brun, V., Muller, H., Andrieux, A. et al. (2003). CD38-dependent ADP-ribosyl cyclase activity in developing and adult mouse brain. *Biochem J.* 370, 175-183.

Cockayne, D.A., Muchamuel, T., Grimaldi, J.C, Muller, H., Randall, T.D. et al. (1998). Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood.* 15;92(4), 1324-33.

Constantinidis, C. & Procyk, E. (2004). The primate working memory networks. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 4(4), 444-65.

Curran, B. & O'Connor, J. J. (2001). The proinflammatory cytokine interleukin-18 impairs long-term potentiation and NMDA receptor-mediated transmission in the rat hippocampus in vitro. *Neuroscience.* 108(1), 83-90.

Deaglio, S., Dianzani, U., Horenstein, A., Fernández, J., van Kooten, C. et al. (1996), Human CD38 ligand. A 120 kDa protein predominantly expressed on the endothelial cells. *J Immunol*,156(2), 727-34.

D'Isa, R., Clapcote, S.J., Voikar, V., Wolfer, D.P., Giese, K.P. et al.(2011). Mice lacking Ras-GRF show contextual fear conditioning but not spatial memory impairments: convergent evidence from two independently generated mouse mutant lines. *Front Behav Neurosci*. 5:78.

Donís, F., Parkhouse, R. & Santos-Argumedo, L. Ontogeny, distribution and function of CD38-expressing B lymphocytes in mice. *Eur J Immunol*. 31(4), 1261-7.

Echavarri, M., Godoy, J.C., y Olaz F. (2007). Diferencias de género en habilidades cognitivas y rendimiento académico en estudiantes universitarios. *Universitas Psychocogica*, 6(2), 319-329.

Eichenbaum H. (1999) The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res*. 103(2), 123-133.

Farhang, S., Barar, J., Fakhari, A., Mesgariabbasi, M., Khani, S. et al. (2014). Asymmetrical expression of BDNF and NTRK3 genes in frontoparietal cortex of stress-resilient rats in an animal model of depression. *Synapse*. 68(9),387-93.

Fellin, T., Pascual, O.& Haydon, P. G. (2006). Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology* (Bethesda) Jun; 21, 208-15.

Ferrero, E., Saccucci, F. & Malavasi, F. (2000). The making of a leukocyte receptor: origin, genes and regulation of human CD38 and related molecules. *Chem Immunol.* 75, 1-19

Foster, J.K. (2003). Special issue on memory: anatomical regions, physiological networks and cognitive interactions. *Cortex* 39(4), 555-65.

Freund, T.F. & Buszaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.*6(4), 347-470.

Fridgeirdottir, G.A., Hillered, L. & Clausen F. (2014). Escalated handling of young C57BL/6 mice results in altered Morris water maze performance. *Ups J Med Sci.* 119(1), 1-9.

Funaro, A., Spagnoli, G., Ausiello, C., Alessio, M., Roggero, S. et al. (1990). Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol.* 145(8), 2390-6.

Gelman, L. Boumsell, L., Debré, P. & Bismuth, G. (1993). The lymphocyte surface antigen CD38 acts as a nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 23(12), 3361-4.

Georgopoulos, A.P., Whang, K., Georgopoulos, M.A., Tagaris, G.A., Amirikian, B. et al. (2001). Functional magnetic resonance imaging of visual object construction and shape discrimination: relations among task, hemispheric lateralization, and gender. *J Cogn Neurosci.* 13(1), 72-89.

Gil, J. A., Macías, J.A., Pastor, J.F., de Paz, F., Barbosa, M. et al. (2003). Diferencias sexuales en el sistema nervioso humano. Una revisión desde el punto de vista psiconeurobiológico. *Revista Internacional de Psicología Clínica y de la Salud.* 3(2), 351-61.

Glick, S.D., Ross, D.A. & Hough, L.B. (1982). Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain. *Brain res.* 234(1), 53-63.

Glover, S.R. & Dixon, P. (2001). Dynamic illusion effects in a reaching task: evidence for separate visual representations in the planning and control reaching. *J Exp Psychol Hum Percept Perform.* 27(3), 560-72.

Gutiérrez, J.M. y Fernández, J.R. (2011). Sustrato neuronal de la memoria de trabajo espacial. *eNeurobiología.* 2(1), 030511.

Harada, N., Chang, R., Grimaldi, J., Lund, F., Brannan, C. et al. (1993). Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker. Homology to human CD38. *J Immunol.* 151(6), 3111-8.

Hartley, T., Lever, C., Burgess, N. & O'Keefe, J. (2013). Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philos Trans. R. Soc Lond B Biol Sci.* 369(1635), 2012510.doi:10.1098/rstb.2012.0510

Heikki, T. (2012). Wading pools and fading memories-place navigation in transgenic mouse models of Alzheimer. *Front. Ag. Neurosci.* 4(11).doi: 10.3389/fnagi.2012.000111.

Higashida, H., Yokoyama, S., Munesue, T., Kikuchi, M., Minabe, Y. et al. (2011). CD38 gene knockout juvenile mice: a model of oxytocin signal defects in autism. *Bio Pham Bull.* 34(9), 1369-72.

Hitti, F.L. & Siegelbaum, S.A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature.* 508(7494), 88-92.

Howard, M., Grimaldi, J. C., Bazan, J. F., Lund, F. E., Santos-Argumedo, L. et al. (1993). Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*. 262(5136), 1056-9.

Jin, D., Liu, H.X., Hirari, H., Torashima, T., Nagai, T. et al. (2007). CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature*. 446(7131), 41-5. Epub 2007 Feb 7.

Johnson, J. D., Ford, E.L., Bernal-Mizrachi, E., Kusser, K.L., Luciani, D.S. et al. (2006). Suppressed insulin signaling and increased apoptosis in CD38-null islets. *Diabetes*. 55(10), 2737-46.

Joseph, P. & De Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y aprendizaje. *Bioteconología*. 14(3), 65-76.

Kandel, E.R. (2009). The Biology of Memory: A Forty-Year Perspective. *The Journal of Neuroscience*. 41, 12748-12756.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. (2006). Principles of Neural Science. Fourth edition. McGraw-Hill.

Kennard, J.A. & Woodruff-Pak, D.S. (2012). A comparison of low-and high-impact forced exercise: effects of training paradigm on learning and memory. *Physiol Behav*. 106(4), 423-7.

Kessels, R.P.C., de Haan, E.H.F., Kappelle, L.J. & Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Rev*. 35(3), 295-303.

Konopleva, M., Rissling, I. & Andreeff, M. (2000). CD38 in hematopoietic malignancies. *Chem Immunol*. 75, 189-206.

Kou, W., Banerjee, S., Eudy, J., Smith, L.M., Persidsky, R. et al. (2009). CD38 regulation in activated astrocytes: implications for neuroinflammation and HIV-1 brain infection. *J Neurosci Res.*87, 2326-39.

Larisch, R., Meyer, W., Klimke, A., Kehren, F., Vosberg, A. et al. (1998). Left-right asymmetry of striatal dopamine D2 receptors. *Nucl Med Commun.* 19(8), 781-7.

Lee, H.C. (2006). Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med.*12(11-12), 317-23.

Lee, T.M.C., Liu, H., Hoosian, R., Liao, W., Wu, C. et al. (2002). Gender differences in neural correlates of recognition of happy and sad faces in humans assessed by functional magnetic resonance imaging. *Neurosci Lett.* 333, 13-6.

Liu, H.X., Lopatina, O., Higashida, C., Tsuji, T., Kato, I. et al. (2008). Locomotor activity, ultrasonic vocalization and oxytocin levels in infant CD38 knockout mice. *Neurosci Lett.* 448(1), 67-70.

Liu, Q., Kriksunov, I. A., Graeff, R., Munshi, C., Lee, H. C. et al.(2005). Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure.* 13(9), 1331-9.

Lopatina, O., Inzhutova, A., Salmina, A.B. & Higashida H. (2013). The roles of oxytocin and CD38 in social or parental behaviors. *Front Neurosci.* 6:182.

Lynch, M.A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory .*Physiol Rev.* 84, 87-136.

Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horestein, A. et al. (2008). Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.* 88(3), 841-86.

Mamik, M.K., Banerjee, S., Walseth, T.F., Hirte, R., Tang, L. et al. (2011). HIV-1 and IL-1 β regulate astrocytic CD38 through mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kB signaling mechanism. *J Neuroinflammation.* 8, 145.

Marin, .I & Kipnis, J. (2013). Learning and memory and the immune system. *Learn Mem.* 20(10), 601-6.

Martin, S.J. & Clark, R.E. (2007). The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cell Mol Life Sci.* 64(4), 401-31.

Mayford, M., Siegelbaum, S.A. & Kandel, E.R. (2012). Synapses and Memory Storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4:a005751

Medina, J. (2014). Estrés, memoria y aprendizaje. Recuperado el 15 de noviembre de 2014, de Estrés, memoria y aprendizaje: <http://www.gador.com.ar/iyd/psiquiatria/pdf/medina.pdf>

Mehta, K., Shahid, U. & Malavasi, F. (1996). Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J.* 10(12), 1408-17.

Mizuguchi, M., Otsuka, N., Sato, M., Ishii, Y., Kon, S. et al. (1995). Neuronal localization of CD38 antigen in the human brain. *Brain Res.* 697(1-2), 235-40.

Morago, A.Y. (2014). La asimetría cerebral en las enfermedades neurodegenerativas. Enfermedad de Parkinson. <http://hdl.handle.net/10953.1/557>.

Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol* .1-15;40(5), 289-97.

Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and motivation*. 12(2), 239-260.

Munesue, T., Yokoyama, S., Nakamura, K., Anitha, A., Yamada, K. et al. (2010). Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls. *Neurosci Res*. 67(2), 181-91.

Nishina, H., Inagena, K., Takahashi, K., Hoshino, S., Ikeda, K. et al. (1994). Cell surface antigen CD38 identified as ecto-enzyme of NAD glycohydrolase has hyaluronate-binding activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 203(2), 1318-23.

Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends neurosci*. 32, 421-31.

Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levey, R. H., Schlossman, S. F. (1980). Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77(3), 1588-92.

Reyes, D., Bulavina, L. & Pivneva T. (2014). La glía, el pegamento de las ideas. *Ciencia* . Abril-junio, 12-18.

Rodriguez, J., Moreno, M., Sandoval, C., Rosales, V., Santos-Argumedo, L. (2008). CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. *Blood*. 111(7), 3644-52.

Rueda, P. E., Montes, C. J., Soria, E., Guzmán, K., Próspero, O. (2006). Dependencia de los sistemas de memoria al ciclo luz-oscuridad en la expresión de estrategias adaptativas. *Salud Mental*. 29(5), 49-58.

Schacter, D.L. & Tulving, E. (1994). What are the memory systems of 1994? En Schacter DL y Tulving (Eds). *Memory Systems*. Cambridge, MA:MIT Press, 1-38.

Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., del Rey, A. et al. (1998). A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(13), 7778-83.

Scoville, W.B. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampus lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiat*. 20, 11-21.

Shapiro, M.L. & Eichenbaum, H. (1999). Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampus neurons. *Hippocampus*. 9(4), 365-84.

Shipton, O.A., El-Gaby, M., Aspergis-Schoute, J., Deissenth, K., Bannerman, D.M. et al. (2014). Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11(42), 15238-43.

Speck, O., Ernst, T., Braun, J., Koch, C., Miller, E. et al. (2000). Gender differences in the functional organization of the brain for working memory. *NeuroReport*. 11, 2581-5.

Stackman, R.W. Jr, Lora, J.C. & Williams, S.B. (2012). Directional responding of C57BL/6J mice in the Morris water maze is influenced by visual and vestibular cues and is dependent on the anterior thalamic nuclei. *J Neurosci.* 32(30), 10211-25.

States, D., Walseth, T & Lee, H. C. (1992). Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem Sci.* 17(12), 495.

Squire, L.R. (1987). *Memory and Brain*. New York:Oxford University Press.

Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus:a synthesis from findings with rats, monkeys and humans. *Psychol Rev.* 99, 195-231.

Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem.* 82(3), 171-7.

Squire, L.R. (2007). Neuroscience. Rapid consolidation. *Science.* 316(5821), 57-8.

Takasaka, S., Tohgo, A., Noguchi, N., Koguma, T., Nata, K. et al. (1993). Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. *J Biol Chem.* 268(35), 26052-4.

Tsien, J.Z. (1996). Subregion-and cell type- restricted gene knockout in mouse brain. *Cell.* 87(7), 1317-26.

Tsien, J.Z., Huerta, P.T. & Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell.* 87(7), 1327-38.

Touzani, K., Puthanveetil, S. V. & Kandel, E.R. (2007). Consolidation of learning strategies during spatial working memory task requires protein synthesis in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(13), 5632-7.

Tulving, E.(1985). How many memory systems are there?. *Am. Psychol.* 40, 385-98.

Tulving, E. (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol.* 53, pp 1-25.

Verderio, C., Bruzzone, S., Zocchi, E., Fedele, E., Schenk, U. et al. (2001). Evidence of a role for cyclic ADP-ribose in calcium signaling and neurotransmitter release in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 78, 646-657

Vicens, P., Redolat, R. & Carrasco, M.C. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema.* 15(4), 539-44.

Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M. et al. (2003). Interleukin-1-beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of Kinases. *J Neurosci.* 23(25), 8692-700.

Wegesin, D.J. (1998). A neuropsychologic profile of homosexual and heterosexual men and women. *Arch Sex Behav.* 27, 91-108.

Weiss, E., Siedentopf, C.M., Hofer, A., Deisenhammer, E.A., Hoptman, M.J. et al. (2003). Sex differences in brain activation pattern during a visuospatial cognitive task: a functional magnetic resonance imaging study in healthy volunteers. *Neurosci Lett.* 344, 169-72.

Wykes, M., Beattie, L., Macpherson, G. & Hart, D. (2004). Dendritic cells and follicular dendritic cells express a novel ligand for CD38 which influences their maturation and antibody responses. *Immunology*. 113(3), 318-27.

Xin, G., Su, Y., Wang, G.F., Zeng, J., Li, K.S. (2012). Asymmetric production of nitric oxide in mouse primary cortical mixed glial cell cultures treated with lipopolysaccharide. *Am J Med Sci*. 344(2), 122-6.

Yamada, M., Mizuguchi, M., Otsuka, N., Ikeda, K. & Takahashi, H. (1997). Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain. *Brain Res*. 756(1-2), 52-60.

Young, G.S., Choleris, E., Lund, F.E. & Kirkland, J.B. (2007). Like niacin deficient rats, cd38^{-/-} mice show improve performance in the water maze. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 5(2/3),111.

Zigmond, M. J. (1999). *Fundamental Neuroscience*. Academic Press.

Zimmerberg, B., Glick, S.D., Jerussi, T.P. (1974). Neurochemical correlate of a spatial preference in rats. *Science*. 185(4151), 623-5.

Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Benatti, U., Bargellesi, A. et al. (1993). A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosylcyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 196(3), 1459-65.

Zocchi, E., Usai, C., Guida, L., Franco, L., Bruzzone, S. et al. (1999). Ligand-induced internalization of CD38 results in intracellular Ca²⁺

mobilization: role of NAD⁺ transport across cell membranes. *FASEB J.*
13(2), 273-83.

ANEXOS

Estandarización del test de Laberinto Acuático de Morris con ratones CD38+/+ ♂.

Con la finalidad de corroborar el comportamiento de nuestros animales en la prueba de LAM reportada en la bibliografía, se realizaron dos tipos de mediciones con distintos grupos de animales, una fue bajo condiciones de “no manipulación”, considerada por el mínimo manejo de los animales por el experimentador y auxiliares, es decir, los animales fueron marcados de su oreja mediante un código de identificación y no se volvieron a cargar, mover o manipular salvo para el cambio de sus camas; en cambio, el otro grupo, denominado “manipulados” consistió en mismo tratamiento que los no manipulados excepto porque cada finalización en los días del ensayo (6 en total) se marcaron con un plumón en la cola para facilitar su manipulación y análisis en los ensayos de LAM.

Un dato notable en los tiempos de latencia de aprendizaje de los animales manipulados parece ser menor a los no manipulados (Fig. 13).

Para dar respuesta a estos resultados, se realizó una revisión bibliográfica que proporciona información al respecto: El estrés es un factor importante en el aprendizaje y la memoria (Medina, 2014) (Fig. 14). Medina explica que si no hay estrés se produce aprendizaje un mal aprendizaje, y que si existe un poco de estrés se mejora el aprendizaje, más aún, si hay bastante estrés, dentro de un rango fisiológico, se genera un gran estado de alerta y de atención, donde se obtiene un máximo de rendimiento y una máxima formación de la memoria; empero, si el estrés supera el nivel fisiológico máximo tolerable, entonces hay más hormona adrenocorticotropina (ACTH), glucocorticoides, epinefrina y entonces la formación de la memoria se dificulta. Además, normalmente, si uno ya aprendió algo y sufre un estrés en el momento de la evocación, el contenido de esa memoria se evocará mal (Medina, 2014). Los glucocorticoides afectan la excitabilidad neuronal; su ausencia o exceso resultan perjudiciales, mientras que las dosis moderadas favorecen la adquisición y el recuerdo de tareas aprendidas

(Joseph y De Gortari, 2007). Experimentos realizados en latencias de retención con ratas, cuando a éstas se les administra un glucocorticoide en el periodo inmediatamente anterior al entrenamiento muestran mejoría en la retención con respecto a las que no recibieron glucocorticoides, si se lesiona la porción más arcaica de la amígdala, la corticomedia, no hay modificación en el aprendizaje, en cambio, cuando se lesiona la parte filogenéticamente más reciente, es decir, la basolateral si se modifica, impidiendo el efecto facilitante del estrés sobre la memoria (Medina, 2014). Cuando se habla de estrés, éste se vincula principalmente a hipocampo, sin embargo, otras áreas del sistema nervioso están involucradas, como la amígdala ya que el aprendizaje cargado de emocionalidad se fija más, mecanismo dependiente de la activación adrenérgica y éste a su vez controla la transmisión gabaérgica; además de ello, una región cerebral especialmente involucrada en el estrés es la corteza prefrontal (Medina, 2014).

Otras investigaciones relacionadas al estrés que genera la manipulación de los animales es descrita por Grudrun A. Fridgeirsdottir y colaboradores en 2013, quienes obtienen los siguientes datos de latencia en ratones CD38+/+ ♂ de 7 semanas que fueron sometidos a LAM con un protocolo previo de manipulación de los animales por el investigador, que consiste en que después de cada día de prueba el experimentador mantiene a los ratones en sus manos para que ellos exploren por unos minutos y después de ello los regresa a sus cajas, considerada esta acción como estrés.(Fig. 15).

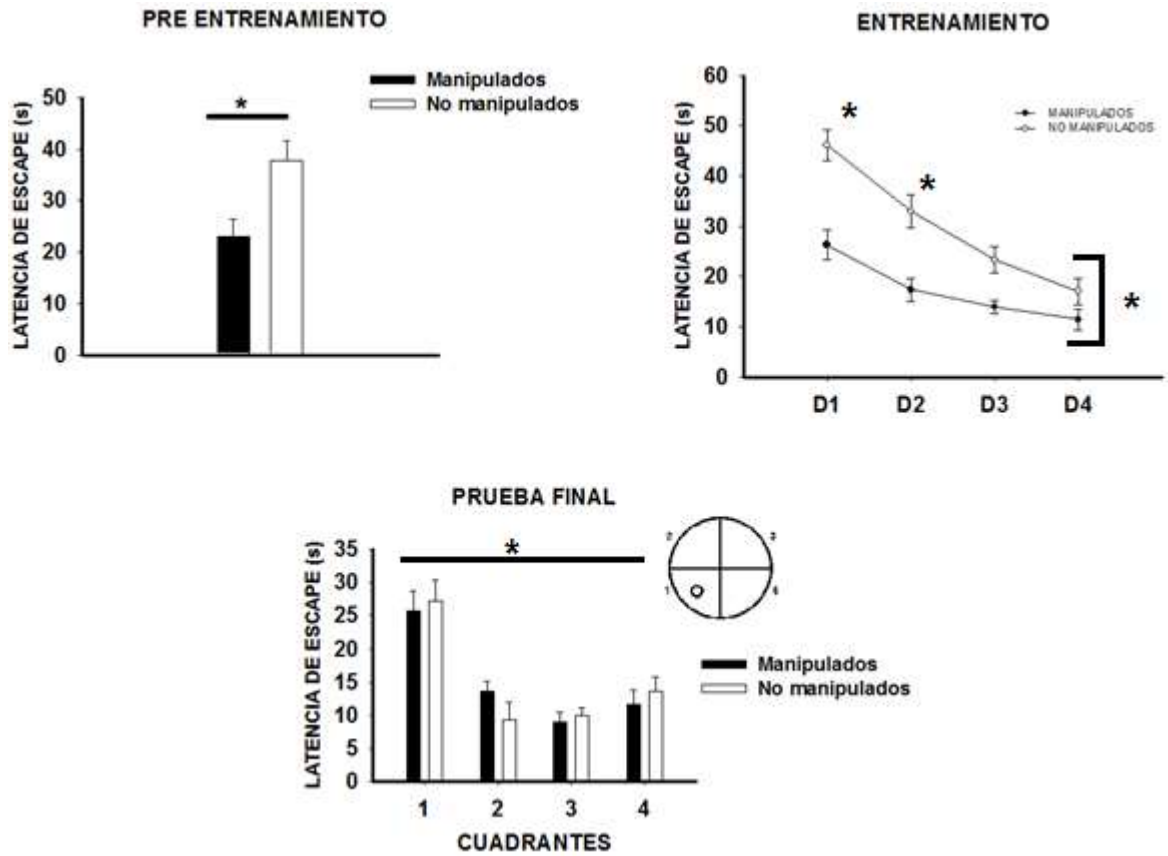


Fig. 13. Estandarización de la técnica de LAM.

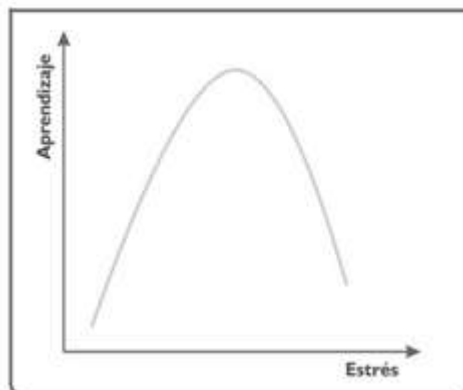


Fig. 14. Relación entre estrés y aprendizaje. Modificada, 2014. Fuente: Medina, 2014.

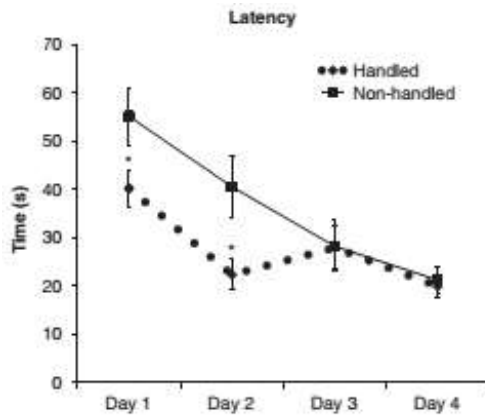


Fig. 15 Latencia para encontrar la plataforma oculta por día, donde los animales manipulados (línea punteada) poseen cortas latencias los días 1 y 2 respecto a los animales no manipulados (línea con cuadros). Fuente: Fridgeirsdottir, Hillered y Clausen, 2014.

Por cuestiones de facilidad en el manejo de los ratones en las pruebas que se realizaron en el presente trabajo, las condiciones para los animales se consideran “Manipulados”.

El análisis estadístico comparativo entre animales manipulados y no manipulados nos proporciona los siguientes datos:

- Un análisis ANOVA de una vía muestra que no existe diferencia entre ratones así como entre intentos. Por medio de una t-student existe diferencia significativa entre animales manipulados y no manipulados en el preentrenamiento ($p=0.006$)
- Un análisis ANOVA de dos vías de medidas repetidas muestra diferencia significativa entre los ratones manipulados y no manipulados ($[F(2,47)=17.080, p=0.009]$), así como entre los días de entrenamiento ($F(2,47)=10.449, p<0.001$).
- En la prueba final, un ANOVA de 2 vías de medidas repetidas muestra que no existe diferencia entre ratones manipulados y no manipulados en ningún cuadrante.

Los animales manipulados parecen requerir menos tiempo para encontrar la plataforma visible en la etapa del preentrenamiento, lo que sugiere una

mejor memoria de trabajo; además parece estar alterado su aprendizaje en los primeros días de entrenamiento, siendo el estrés el factor sugerente en la disminución en los tiempos de latencia a lo largo de los días, aunque ambos grupos de animales logran mismos aprendizajes hacia el día final de la fase de aprendizaje, alcanzando la plataforma oculta en tiempos semejantes; ello nos indica que ambos animales aprenden la estrategia, durante la ejecución de esta prueba. Además ambos grupos de ratones poseen memoria espacial semejante.