

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS CON LA CONSOLIDACIÓN DE LA
MEMORIA EN EL NEOESTRIADO MEDIANTE MICROARREGLOS DE cDNA.**

Tesis que presenta el pasante Arnulfo Díaz Trujillo, como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Cotutores:

Dr. Roberto A. Prado Alcalá

Dr. Alfredo Varela Echavarría

JURIQUILLA, QRO. A DICIEMBRE DEL 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi esposa Jessica y a mi pequeño hijo León Eduardo.

A mi padres Arnulfo y Enma Concepción

AGRADECIMIENTOS

A mis cotutores, el Dr. Roberto Prado Alcalá por su invaluable orientación en el desarrollo de la presente tesis y en mi formación académica y científica. Y al Dr. Alfredo Varela Echavarría por su valiosa asesoría y apoyo en la sección de biología molecular de este trabajo. Así como por sus contribuciones en la revisión del presente escrito.

A los integrantes de mi comité tutorial, los Drs. Víctor Alemán y Juan Riesgo Escovar, y a mi jurado de examen de grado, las Dras. Sofía Díaz y María Isabel Miranda, por sus apreciables aportaciones al presente escrito.

A la Dra. Gina Lorena Quirarte por sus útiles observaciones en la parte conductual del trabajo de tesis.

A Leopoldo González Santos por su indispensable ayuda en el análisis de los microarreglos; así como al departamento de imágenes por permitir el uso de su equipo de cómputo.

A Erika Galindo por su colaboración en los experimentos conductuales y en la disección del cerebro de los animales.

A los demás compañeros integrantes del laboratorio, especialmente a Cesar Quiroz por las interesantes discusiones sobre la memoria, al Sr. Ángel por su apoyo en el cuidado de los animales y la limpieza del material, y a Norma por su ayuda en la compra de material del laboratorio.

A los integrantes del laboratorio A-03, en especial a Carmen Mejía Viggiano por su asesoría en el manejo de material radioactivo, en las hibridaciones en las membranas de microarreglos, y en el uso del “phosphorimager” y el software de análisis de imágenes; así como por su apoyo en toda la parte de biología molecular del trabajo de tesis. También a Conchita por su apoyo en la obtención de reactivos y material

A Gabriel Nava por sus indispensables consejos y apoyo técnico en los métodos de biología molecular.

Al MVZ. José Martín García Servín, por proporcionar los animales requeridos para el desarrollo de los experimentos.

A la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala del departamento de imágenes por su apoyo en los exámenes tutorales con el equipo de videoconferencia.

A la Lic. Ma. del Pilar Galarza Barrios y el personal de la biblioteca por su apoyo en la obtención de material bibliográfico.

A Leonor Casanova Rico, Yolanda Orduña y Ma. del Carmen Vázquez Rodríguez por su oportuno apoyo en todos los trámites realizados durante la maestría.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES	
2.1 LOCALIZACIÓN Y FORMA DEL NEOESTRIADO.....	3
2.2 NEURONAS Y BIOQUÍMICA DEL ESTRIADO.....	4
2.3 COMPARTIMIENTOS DEL NEOESTRIADO.....	5
2.4 CONEXIONES AFERENTES Y EFERENTES DEL NEOESTRIADO.....	6
2.5 MEMORIA Y APRENDIZAJE.....	9
2.6 MOLÉCULAS DE LA MEMORIA.....	10
2.7 PAPEL DEL NEOESTRIADO EN PROCESOS DE MEMORIA Y APRENDIZAJE.....	25
2.8 LA TECNOLOGIA DE MICROARREGLOS.....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVO.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODO.	
6.1 TAREA DE APRENDIZAJE.....	29
6.2 DISECCIÓN.....	32
6.3 PREPARACIÓN DEL RNA.....	32
6.4 PREPARACIÓN DE LAS SONDAS DE cDNA.....	34
6.5 PROCEDIMIENTO DE HIBRIDACIÓN.....	35
6.6 ANÁLISIS DE LOS MICROARREGLOS.....	36
7. RESULTADOS.....	38
8. DISCUSION.....	48
9. CONCLUSION.....	55
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
11. APÉNDICE A. ESTABLECIMIENTO DE LA TAREA DE APRENDIZAJE EN UN ENSAYO.....	70
12. APÉNDICE B. ABREVIATURAS.....	101

RESUMEN

La memoria es el almacenamiento de la información derivada de las experiencias de aprendizaje. Para que ocurra un almacén estable, de largo plazo, debe transcurrir un tiempo o periodo de consolidación; lapso crítico, durante el cual la memoria es susceptible a las interferencias.

Durante la consolidación, una cascada de eventos moleculares desencadenan cambios en la expresión de genes, que se han asociado con el crecimiento (o poda) de conexiones sinápticas y cambios en la eficiencia sináptica de largo plazo. En el hipocampo, se han identificado genes, cuya expresión se modifica después de la experiencia de aprendizaje. Sin embargo, se desconoce cuáles genes son relevantes en otras estructuras que también participan en los procesos de memoria, como el neocórtex, cuya participación ha sido estudiada de manera exhaustiva.

Con base en las evidencias anteriores, nos propusimos analizar en el neocórtex la colección de genes involucrados en la consolidación de la memoria. Para ello, se empleó la tecnología de microarreglos y se implementó una tarea robusta de aprendizaje de un ensayo, que permitiera una condición control en la que los animales recibieran estímulos sensoriales similares, pero que no aprendieran la tarea. Se identificaron trece genes, los cuales codifican factores de transcripción, moléculas de señalización intracelular, una metaloproteinasa de la matriz, enzimas del metabolismo, y una proteína con posible función hormonal.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo del proceso evolutivo, los organismos del reino animal han desarrollado mecanismos funcionales que permiten el mantenimiento adecuado de la homeostasis, y han mejorado tanto las capacidades para detectar las fuentes que suministran nutrimentos, como a los depredadores de los que tienen que huir. Estos organismos poseen una capacidad reproductiva eficaz que permite la conservación de las especies. Además de contar con esta capacidad, en gran parte de los individuos del reino animal hubo dos avances evolutivos importantes que les ha ayudado a adaptarse mejor a su medio: el aprendizaje y la memoria.

La ubicación de la memoria (el almacén de información derivada de la experiencia) en el cerebro, ha sido un tema muy discutido a lo largo de los siglos (Prado-Alcalá, 1998). Está documentado ampliamente que las lesiones en algunas partes del cerebro provocan dificultades en el aprendizaje y la memoria. El hecho de que lesiones en ciertas áreas del cerebro provoquen efectos amnésicos (pérdida de la memoria) hace pensar que la memoria tiene su localización en ciertas estructuras cerebrales, o que los circuitos de éstas están involucrados en la formación de aquélla (Bermúdez-Rattoni, 1998). El conocimiento de las funciones mentales del ser humano se ha basado principalmente en el estudio de sus patologías cognitivas. Sin embargo, este tipo de estudio habitualmente no nos permite hacer manipulaciones experimentales con las que se pudieran establecer claramente interrelaciones (causa-efecto) entre estructuras cerebrales, eventos fisiológicos y funciones mentales. Una alternativa para el estudio experimental de las bases biológicas de dichas funciones es el uso de modelos en animales infrahumanos (Prado-Alcalá y Quirarte, 1993). La exploración de diversas estructuras cerebrales mediante técnicas más sofisticadas van desde registros electrofisiológicos y administración local de drogas, hasta la síntesis de receptores membranales, medición de la liberación de neurotransmisores, el transplante de tejido fetal en cerebros dañados y diversos estudios moleculares (Prado-Alcalá, 1998). Identificar los mecanismos responsables de la formación de la memoria constituye un meta de las neurociencias, entre estos, aquellos que ocurren a nivel molecular.

2. ANTECEDENTES

Durante más de veinte años, en nuestro laboratorio hemos estudiado una de las estructuras cerebrales que ha sido implicada en los procesos de aprendizaje y memoria: el neostriado. En el presente trabajo de tesis trataremos de detectar la expresión de genes en el neostriado, asociada con el aprendizaje de evitación inhibitoria. Por esta razón, es menester hacer una breve descripción anatómica de esta estructura.

2.1 Localización y forma del neostriado

Los ganglios o núcleos basales están constituidos por varias masas de sustancia gris subcortical situadas profundamente en los hemisferios cerebrales y son considerados derivaciones telencefálicas. Junto con los sistemas motores que ejercen influencias sobre las neuronas motoras bajas, se les denomina sistema extrapiramidal (Graybiel et al., 1979). Los componentes principales de los ganglios basales son: el estriado (caudado-putamen), el globo pálido, la sustancia nigra y el núcleo subtalámico (Albin et al., 1989). El núcleo caudado tiene una porción anterior llamada cabeza, que está conectada directamente con el putamen en la parte más anterior de la misma; hacia la parte posterior los separa la cápsula interna. Una región intermedia llamada cuerpo forma un arco que disminuye en espesor al hacer curva alrededor del tálamo y está adyacente a este mismo. La cola, que es la parte más delgada del núcleo caudado y que es la continuación del cuerpo, se dirige en dirección rostral y termina cerca de la amígdala. Forma parte del piso de la prolongación frontal del ventrículo lateral y del cuerpo de dicha cavidad, su cola llega al techo de la prolongación temporal y la región del núcleo que está en contacto con la cavidad ventricular, se halla recubierta por el epéndimo. Entre el tálamo y el núcleo caudado se encuentra el surco tálamo-estriado, por el cual cursan la estría terminal y la vena tálamo-estriada. La estría terminal es un sistema de fibras que une los lóbulos temporales de ambos hemisferios pasando a través de la comisura anterior y que acompaña al caudado hasta la prolongación temporal. Los núcleos lentiforme (globo pálido y putamen) y caudado se engloban bajo el nombre genérico de cuerpo estriado, el pálido se conoce como paleostriado, el cuerpo

amigdaloido como arquiestriado y el núcleo caudado y el putamen como neostriado o estriado (Graybiel et al., 1979; Kitai, 1981; Moyer, 1983).

En mamíferos tales como los roedores, el estriado forma una masa nuclear de gran extensión, el caudado-putamen, el cual es penetrado por las fibras cruzadas de la cápsula interna de tal forma que los homólogos del caudado y el putamen no pueden diferenciarse entre sí (Graybiel et al., 1979). En carnívoros y en primates el estriado está separado casi completamente en caudado y putamen por la cápsula interna que forma una lámina gruesa de fibras (Kemp y Powell, 1971).

2.2 Neuronas y bioquímica del estriado

De acuerdo a Carpenter (1994) las células del núcleo caudado y el putamen son idénticas y no presentan laminación ni disposición particular. El neostriado puede no ser tan uniforme como parece, porque en su desarrollo células de diferentes tipos migran en grupos, la actividad histoquímica tiene una distribución irregular y las neuronas eferentes muestran cierta separación. Las neuronas del neostriado se dividen en dos categorías: 1) las que poseen dendritas espinosas y 2) las que poseen dendritas lisas.

Las neuronas espinosas consideradas las neuronas más numerosas del estriado son ovales y redondeadas, de tamaño mediano, emiten múltiples dendritas primarias cubiertas con espinas y tienen axones largos. En el neostriado se identifican dos tipos de neuronas espinosas de acuerdo a sus características morfológicas. Las neuronas espinosas del neostriado sirven como neuronas receptoras y de proyección. La mayor parte de los aferentes de diversos orígenes terminan en prolongaciones espinosas de estas neuronas. Todas las fibras que se proyectan más allá del neostriado se originan en neuronas espinosas del neostriado. Desde el punto de vista inmunocitoquímico las neuronas espinosas del neostriado son heterogéneas, contienen ácido gama-amino-butírico (GABA), sustancia P, encefalina y tal vez neurotensina. Muchas neuronas espinosas del neostriado contienen más de un neurotransmisor y las sustancias transmisoras se presentan en diferentes combinaciones. A pesar de esta heterogeneidad química, el GABA es el neurotransmisor predominante.

Las neuronas no espinosas tienen axones cortos y son intrínsecas del neocórtex. De ellas se han descrito tres tipos. La neurona no espinosa tipo I se distingue por su tamaño pequeño, dendritas varicosas y recurrentes, y un axón corto muy arborizado. Grandes cantidades de neuronas no espinosas de tipo I son gabaérgicas, pero muchas neuronas de este tipo son inmunorreactivas al neuropéptido Y y a la somatostatina, generalmente de forma colocalizada. Las neuronas no espinosas de tipo II tienen grandes cuerpos celulares, núcleos excéntricos y dendritas que se prolongan más de 250 μm . Estas células corresponden a una subpoblación de neuronas gigantes distribuidas de manera uniforme en todo el neocórtex; presentan colina acetiltransferasa y acetilcolinesterasa (AChE). Se ha demostrado que las neuronas no espinosas colinérgicas gigantes del neocórtex establecen sinapsis simétricas con neuronas espinosas de tamaño medio que son el destino principal de las terminaciones dopaminérgicas procedentes de la sustancia nigra. Se considera que estas neuronas colinérgicas desempeñan una función fundamental en el mantenimiento del equilibrio en el neocórtex entre dopamina y GABA. No se ha identificado el neurotransmisor de las neuronas espinosas tipo III.

2.3 Compartimientos del neocórtex

Abundantes trabajos sugieren que el córtex es heterogéneo y que está formado por islotes de células llamadas estriosomas, en las cuales la AChE se tiñe débilmente y están inmersas en una matriz que en cambio se tiñe en mayor proporción (Graybiel, 1983; Graybiel et al., 1981, 1989; Joyce et al., 1986; Gerfen et al., 1987). Los estriosomas pueden ser visualizados con base en diversos marcadores neuroquímicos, tipos de neurotransmisores, receptores y enzimas contra una matriz de fondo en el córtex (Goldman y Nauta, 1977; Olson et al., 1972; Lanca et al., 1986). Los estriosomas consisten en áreas macroscópicas discretas, de 0.2 a 1.2 mm^2 , distribuidos a través del neocórtex (Ferrante et al., 1986; Graybiel y Ragsdale, 1983) en los cuales se encuentran concentrados receptores μ a opiáceos (Herkenham y Pert, 1981; Vonsattel et al., 1985) péptidos opioides como **leu** y **met**-encefalinas (Gerfen, 1984; Graybiel y Chesselet, 1984), neurotensina (Goedert et al., 1983) y sustancia P (Gerfen, 1984; Graybiel et al., 1981).

La matriz tiene otros marcadores tales como elevada actividad de AchE (Ferrante et al., 1986; Graybiel y Ragsdale, 1983) y nicotinamida-adenin-nucleótidos fosfato diaforasa (NADPH-diaforasa) (Ferrante et al., 1987), así como somatostatina (Gerfren, 1984) receptores a neurotensina (Goedert et al., 1984) y dopamina (Loopuijtl et al., 1987).

Se desconoce el papel de la compartimentalización del neostriado en el aprendizaje y la memoria.

2.4 Conexiones aferentes y eferentes del neostriado

El estriado es blanco de aferencias de la mayoría de las áreas de la corteza y tiene eferencias a otros componentes de los ganglios basales. Las aferencias corticales son excitatorias y utilizan glutamato como principal neurotransmisor (Kitai et al., 1976; Spencer, 1976). Las eferencias del estriado son inhibitorias (Deniau et al., 1976) y todas utilizan GABA como neurotransmisor (Yoshida y Precht, 1971).

Aferencias del neostriado

El núcleo caudado y el putamen reciben los principales sistemas aferentes que se proyectan al cuerpo estriado. Las principales fibras aferentes se originan en la corteza cerebral, partes de la amígdala, los núcleos talámicos intralaminares, la sustancia nigra y el núcleo dorsal del rafe (Carpenter, 1994).

Fibras corticoestriadas: De acuerdo a Carpenter (1994), virtualmente todas las regiones de la neocorteza proyectan fibras al neostriado. Ninguna parte del neostriado se encuentra bajo la influencia de una sola zona de la corteza.

Las terminaciones corticoestriadas forman en el neostriado patrones en forma de mosaico, muchas de las áreas corticales tienen proyecciones extensas en varias partes del neostriado y las áreas corticales ampliamente separadas dan origen a campos terminales superpuestos. Las placas de terminaciones neostriadas que se originan en diferentes áreas corticales no sólo se superponen entre sí, sino también pueden superponerse con otras terminales de proyección de otros aferentes neostriatales. Los aferentes neostriatales de la corteza cerebral terminan principalmente en las espinas dendríticas de las neuronas

espinosas del neostriado y son excitadores. Todas las neuronas corticoestriatales son piramidales y utilizan glutamato como neurotransmisor (Gerfen y Wilson, 1996) y probablemente somatostatina (McGeer et al., 1984).

Fibras amígdaloestriadas: Existe una relación estrecha entre ambas estructuras. Las proyecciones de la amígdala laterobasal a la región ventromedial del núcleo caudado y a las partes ventrocaudales del putamen indican que el neostriado no se puede dividir en porciones “límbica” y “no límbica”.

El neostriado “no límbico” más pequeño ocupa una región anterodorsolateral. Además, en el mono, la cabeza del núcleo caudado recibe proyecciones directas de las células de la sustancia innominada que recibe impulsos de la amígdala. Esta parcelación del neostriado en distintas regiones sobre la base de las proyecciones amigdalinas sugiere que grandes porciones del neostriado “límbico” pueden estar relacionadas con fenómenos conductuales (Carpenter, 1994). Los neuromoduladores son la colecistoquinina y la somatostatina (McGeer et al., 1984).

Fibras talamoestriadas: Los núcleos talámicos intralaminares más grandes (el complejo nuclear centromediano-parafascicular) tienen proyecciones subcorticales al neostriado. En el mono, las células del sistema centromediano se proyectan sólo al putamen; las células del núcleo parafascicular se proyectan sólo al núcleo caudado.

Las células de los núcleos talámicos central lateral y paracentral contienen dos poblaciones de neuronas que proyectan: una a la corteza, y otra al núcleo caudado. En los núcleos centromediano y paracentral, los relevos monosinápticos de la formación reticular mesencefálica conducen impulsos por separado a las áreas corticales y al núcleo caudado. Las fibras talamoestriadas terminan en el núcleo caudado y el putamen como las corticoestriadas, en conjuntos con forma de disco en mosaico o anillos huecos. Las fibras talamoestriadas terminan en las neuronas espinosas del neostriado y se cree que son excitadoras, pero no se conoce el neurotransmisor empleado. Según McGeer et al. (1984) probablemente sean glutamato, aspartato o acetilcolina.

Fibras nigroestriadas: La sustancia nigra proyecta fibras dopaminérgicas al neostriado. Las células de los dos tercios rostrales de la parte compacta de la sustancia nigra proyectan a la cabeza del núcleo caudado, en tanto que aquellas que proyectan al putamen están en regiones más posteriores. En general se acepta que la dopamina ejerce

una acción inhibitoria sobre las células del neostriado. En el neostriado se han identificado farmacológicamente los receptores para dopamina tipo D1 y D2. El patrón de unión de los receptores D1 y D2 no corresponde con la heterogeneidad en placas que se observa en la tinción con acetilcolinesterasa, pero en la matriz se localizan las áreas con la mayor densidad de receptores. La activación de los receptores D1 disminuye la excitabilidad de la membrana, en tanto que la activación de los receptores D2 ocasiona una disminución en la liberación de la sustancia neurotransmisora en las terminaciones sinápticas. Ambos receptores parecen funcionar de manera sinérgica para modular las actividades neuronales. Gerfen y Wilson (1996) mencionan la posibilidad de que estas fibras dopaminérgicas puedan liberar la dopamina no sinápticamente al espacio extracelular donde podrían interactuar con receptores extrasinápticos. Alternativamente la dopamina podría escapar de la región sináptica y difundir a los receptores extrasinápticos a la neurona postsináptica u otros procesos celulares en el neurópilo. Un 20% de las fibras nigroestriadas se consideran no dopaminérgicas, pero sus células de origen no están identificadas (Carpenter, 1994).

Aferentes de los núcleos del Rafe: Los núcleos dorsal y medio del rafe suministran dos sistemas serotoninérgicos ascendentes distintos, que se superponen de manera parcial. Las proyecciones serotoninérgicas que se originan en el núcleo dorsal del rafe terminan en las regiones ventrocaudales del neostriado. La mayor parte de las neuronas del núcleo dorsal del rafe proyectan colaterales al neostriado y a la sustancia nigra. La estimulación del núcleo dorsal del rafe produce una inhibición prolongada de las neuronas del neostriado.

Otras aferentes provienen del globo pálido (gabaérgicas), del locus coeruleus (noradrenérgicas), de los cuerpos mamilares y de la formación reticular cuyas fibras son histaminérgicas (McGeer et al., 1984).

Eferencias del Neostriado

El estriado envía a la sustancia nigra una proyección masiva (del 65 al 70% de sus neuronas) que termina en la zona reticulada. Los neurotransmisores son el GABA, la sustancia P, la dinorfina y la colecistoquinina. También proyecta al globo pálido empleando

al GABA, la encefalina y la dinorfina como neurotransmisores y al núcleo entopeduncular por fibras gabaérgicas (McGeer et al., 1984).

2.5 Memoria y Aprendizaje

Como se indicó al inicio de la introducción, en este trabajo realizamos un estudio acerca de la participación del neocórtex en un tipo particular de aprendizaje. Es por ello que en esta sección haremos una relación de conceptos relacionados con esta función, así como con la memoria.

Aunque existen múltiples conceptos sobre el aprendizaje, la mayoría de ellos coincide en que este proceso es un cambio en la conducta, relativamente permanente, que resulta de la experiencia (Prado-Alcalá, 1991), lo cual implica un almacenamiento de la información derivada de las experiencias de aprendizaje, es decir, la memoria (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998).

En la actualidad el trabajo de los científicos interesados en el estudio de las bases biológicas de la memoria está centrado en la búsqueda del engrama, término introducido en el campo por el biólogo alemán Richard Semon en 1904. El engrama puede ser definido como el conjunto de cambios en el sistema nervioso que representan a la memoria almacenada (Squire, 1987). Esta búsqueda ha originado dos grandes líneas de investigación, una la constituye la búsqueda de los mecanismos fisiológicos de los que depende el almacenamiento de información, y la segunda la búsqueda de las estructuras cerebrales involucradas en dicho almacenamiento; entre los mecanismos fisiológicos que subyacen al establecimiento de la memoria se encuentran: a) cambios en la cantidad de mediadores químicos en la sinapsis que participan en el proceso, y b) incremento en la síntesis de proteínas neuronales (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998).

De acuerdo a Bailey y cols. (1996), la memoria puede ser dividida en al menos dos categorías generales: la memoria explícita o declarativa, que es el recuerdo consciente de conocimiento sobre personas, lugares y cosas, que está particularmente bien desarrollada en el cerebro de los vertebrados, y la memoria implícita o no declarativa, que es el recuerdo inconsciente de habilidades motoras y otras tareas e incluye formas asociativas simples como el condicionamiento clásico y formas no asociativas como la sensibilización y la

habituaación. Los dos tipos de memoria parecen involucrar diferentes circuitos neurales. La memoria explícita depende fundamentalmente de estructuras del lóbulo temporal y diencefálicas (como el hipocampo, el subiculum y la corteza entorrinal) mientras la implícita no depende de la función del lóbulo temporal, sino que involucra las mismas vías motoras, sensoriales o asociativas usadas en la expresión del aprendizaje. Tanto la memoria explícita como la implícita pueden dividirse en al menos dos componentes temporales: la memoria de corto plazo (con duración de minutos a horas) y la memoria de largo plazo (con duración de días, semanas y en algunas casos de por vida).

2.6 Moléculas de la memoria

Muller y Pilzecker en 1900, encontraron que después de que un evento ha sido registrado en la memoria debe pasar un tiempo para lograr una forma estable de almacenamiento de largo plazo. En este período, que ellos llamaron periodo de consolidación, la memoria es sensible a interferencias. Por ejemplo, la consolidación en una memoria de largo plazo de una lista de sílabas sin sentido puede ser interferida dando a los individuos una segunda lista a aprender (interferencia retroactiva). También las lesiones en la cabeza o concusiones cerebrales pueden producir amnesia retrógrada de eventos ocurridos unos minutos u horas antes del mismo, al igual que las convulsiones epilépticas. En 1901 el psicólogo William McDougall sugirió que la amnesia retrógrada ocurrida en los casos de concusiones y convulsiones podrían ser debidas a una falla en la consolidación. Posteriormente C.P. Duncan encontró en animales experimentales y en humanos que las tareas recientemente aprendidas eran dañadas por convulsiones epilépticas, y de forma más severa cuando ocurrían más cercanamente después del entrenamiento. El primer paso hacia el entendimiento bioquímico del establecimiento de la memoria de largo plazo ocurrió cuando Flexner y subsecuentemente el grupo de Agranoff, observaron que la formación de la memoria de largo plazo requiere la síntesis de proteínas nuevas, mientras que la de corto plazo no. Justo antes del entrenamiento los animales fueron inyectados con un inhibidor de la síntesis de proteína (cicloheximida o anisomicina); ambos grupos aprendieron muy bien, pero el grupo tratado con el inhibidor mostró una amnesia profunda cuando se probó tres o más horas después (Squire y Kandel, 2000).

Estudios posteriores de la memoria de largo plazo para aprendizajes implícitos y explícitos indican que emplean una cascada de eventos moleculares que ocurren durante su período de consolidación (la fase inicial del almacenamiento de la memoria). En ambos casos la conversión de la memoria de corto plazo que es transitoria (que requiere sólo la modificación covalente de proteínas preexistentes capaces de alterar rápidamente la eficiencia sináptica) a una forma más estable de largo plazo es acompañada por el crecimiento de nuevas sinapsis y requiere un programa celular de expresión de genes y un incremento en la síntesis de proteínas. La consolidación de formas simples de memoria implícita involucra tres procesos: expresión de genes, síntesis de proteínas nuevas y el crecimiento (o poda) de conexiones sinápticas (Bailey et al., 1996). Las proteínas recién sintetizadas también pueden reestructurar los procesos en la sinapsis y por lo tanto alterar la eficiencia de la transmisión sináptica a largo plazo (Cavallaro et al., 2001).

Mecanismos moleculares de la memoria en Aplysia

Entre los primeros estudios en los que se describieron algunos de los mecanismos moleculares que subyacen al almacenamiento de la memoria destacan los realizados en *Aplysia*. En contraste con los trillones de neuronas del cerebro de los mamíferos, el sistema nervioso central de un invertebrado como *Aplysia* tiene 20,000 neuronas, estas se encuentran entre las más grandes del reino animal (aprox. 1000 μ m) y las conductas mas simples que pueden ser modificadas por aprendizaje involucran menos de 100 neuronas.

Uno de estos aprendizajes es la sensibilización del reflejo de retracción de la agalla, en el que se produce un aumento en la fuerza del mismo conjunto de sinapsis que son deprimidas por el aprendizaje opuesto, la habituación. El incremento en la fuerza sináptica (facilitación) resultado de la sensibilización es heterosináptica; el choque en la cola activa una vía que modifica la fuerza de las conexiones entre la neurona sensorial (del sifón) y sus células blanco (interneuronas y motoneuronas). La vía proveniente de la cola involucra la activación de neuronas sensoriales que a su vez activan interneuronas moduladoras (serotonérgicas). En la neurona sensorial del sifón hay un incremento de cAMP (adenosin monofosfato cíclico) como consecuencia de la liberación de serotonina por las interneuronas moduladoras. El cAMP, activa a la subunidad catalítica de la protein cinasa A (PKA) liberándolo de su subunidad reguladora y el PKA fosforila canales de K⁺ y

proteínas asociadas, lo cual produce la reducción de la entrada de potasio produciéndose un ensanchamiento del potencial de acción y por lo tanto un incremento en la entrada de Ca^{2+} que va a causar mayor liberación de neurotransmisor. El PKA parece actuar también sobre las proteínas involucradas en la movilización, fusión y liberación de vesículas (Bailey et al., 1996; Squire y Kandel, 2000)

La activación repetida de las neuronas serotoninérgicas desencadena la facilitación a largo plazo, la cual es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas; en tal caso el PKA se transloca al núcleo donde fosforila un número de factores de transcripción, sin embargo el más importante es la proteína CREB1 (proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP-1). La forma fosforilada de CREB1 se une al sitio CRE (elemento de respuesta a cAMP) en el DNA y “enciende” los genes necesarios para la formación de la memoria de largo plazo (Squire y Kandel, 2000). La importancia de CREB1 en el proceso de facilitación a largo plazo se demostró mediante dos experimentos; en el primero se inyectó la secuencia CRE en grandes cantidades en el núcleo de *Aplysia* de tal forma que CREB1 fosforilado no pudiera unirse a su blanco en el DNA celular. El resultado fue que se bloqueó la memoria de largo plazo sin interferir con el proceso de corto plazo (Dash et al., 1990). En el segundo experimento la inyección de la proteína CREB1 fosforilada en las neuronas sensoriales de *Aplysia* fue no sólo necesaria, sino suficiente para alcanzar la facilitación de largo plazo (Bartsch et al., 1998).

Adicionalmente la proteína CREB2 inhibe las acciones de CREB1, se une también al sitio CRE y por lo tanto bloquea la facilitación a largo plazo. CREB2 parece ser regulada por una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Bloqueando este represor se reduce el umbral para convertir la memoria de corto plazo en una de largo plazo (Bartsch et al., 1995).

La regulación coordinada de al menos dos factores de transcripción: la activación de CREB1 y la desactivación del represor CREB2 permite la inducción rápida de genes tempranos de respuesta inmediata. Algunos de estos genes tempranos parecen ser responsables de la expresión de genes tardíos responsables de la fase de estabilización (presumiblemente estructurales); esto explica por qué el proceso es dependiente de la síntesis de proteínas. Estos genes tempranos que se sintetizan durante la fase de consolidación pueden ser proteínas efectoras o factores de transcripción. La memoria de

duración de horas es mantenida durante la vida media de las proteínas efectoras o por sus modificaciones funcionales como la fosforilación. Las memorias que duran días, semanas o meses (más que la vida media de las proteínas efectoras) es iniciada por los genes regulatorios tempranos, cuyos productos proteicos desencadenan el mantenimiento de la expresión de genes efectoros tardíos los cuales pueden contribuir a estabilizar el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas que coinciden con la fase de mantenimiento de la memoria de largo plazo (Bailey et al., 1996; Squire y Kandel, 2000).

La facilitación a largo plazo en la neurona sensorial de *Aplysia* ocurre de forma restringida en la sinapsis estimulada. Aunque los pulsos repetidos de serotonina mandan una señal al núcleo para activar a CREB1 y éste parece enviar nuevas proteínas a todas las terminales, sólo aquellas terminales marcadas por serotonina pueden usar las proteínas productivamente para el crecimiento sináptico. La marca dejada en la sinapsis por el neurotransmisor pudiera estar relacionada con la regulación de la síntesis de proteína local, ya que se ha demostrado que las dendritas contienen ribosomas, y que RNA mensajeros (RNAm) específicos son transportados a las dendritas y traducidos ahí (Kandel 2001).

Mecanismos moleculares de la memoria en Drosophila

La mosca de la fruta *Drosophila* es capaz de aprender muchas cosas. Pueden aprender a escapar de olores específicos que previamente han experimentado acompañados de un choque eléctrico (Quinn et al., 1974; Tully y Quinn, 1985). Las moscas hambrientas pueden aprender a dirigirse hacia olores que previamente han sido asociados con una recompensa de azúcar (Tempel et al., 1983). También aprenden con señales visuales, táctiles, propioceptivas y espaciales (Menne y Spatz, 1977; Folkers, 1982; Guo et al., 1996; Booker y Quinn, 1981; Wustmann et al., 1996; Wustmann y Heisenberg, 1997).

De acuerdo a Waddell y Quinn (2001) mutantes en el gen “dunce” (*dnc*) que codifica para una cAMP-fosfodiesterasa (degrada cAMP), y las mutantes para “rutabaga” (*rut*) que codifica para la adenilato ciclasa (tipo I) estimulada por calcio/calmodulina (sintetiza cAMP), tienen deficiencias de memoria. Otros mutantes que tienen deficiencias de memoria son “amnesiac” (*amn*) y DC0. Amnesiac es deficiente en un gen para un transmisor sináptico peptídico que estimula la adenilato ciclasa y DC0 es deficiente en la subunidad catalítica de la PKA.

Mutantes del gen “turnip” (tur), también tienen deficiencias de memoria de largo plazo, presentan baja actividad PKC (proteína cinasa C), aunque no codifican para genes de la familia de la PKC (Choi et al., 1991; Waddell y Quinn, 2001).

Otros genes implicados en procesos de memoria y aprendizaje han sido identificados mediante mutación inducida por el elemento P, entre ellos se encuentran los genes “latheo” (lat), y “nalyot” (nal). Lat codifica para un componente del complejo de reconocimiento del origen de replicación del DNA, dicha proteína se detecta en los botones presinápticos, y los mutantes tienen propiedades sinápticas anormales (Pinto et al., 1999; Rohrbough et al., 1999). Nalyot codifica para el factor de transcripción Adfl, la mutación parcial (la pérdida completa de la función de nal es letal) produce ligeros efectos sobre el aprendizaje, pero efectos profundos sobre la memoria de largo plazo (DeZazzo et al., 2000).

El mutante “volado” (vol) tiene también deficiencias de memoria de corto plazo. El gen codifica para integrinas que tienen influencia en la morfología y función sináptica (Grotewiel et al., 1998; Rohrbough et al., 2000).

Los mutantes “leonardo” (leo) tienen defectos en el aprendizaje de tareas olfatorias y la memoria de corto plazo. La mutación afecta la proteína 14-3-3 la cual está involucrada en varias rutas de señalización intracelular. La familia de estas proteínas pueden activar o reprimir la actividad PKC, activar la tirosina hidroxilasa y la triptofano hidroxilasa (enzimas limitantes en la biosíntesis de catecolaminas y serotonina) e interactuar con Raf-1 en la vía de las MAPK. La proteína Leo está presente en las terminales sinápticas y los mutantes presentan una reducción en la transmisión sináptica (Waddell y Quinn, 2001).

Adicionalmente se han diseñado moscas mutantes por medio de ingeniería genética mediante la cual se han obtenido datos relevantes. De forma similar a como ocurre en *Aplysia*, en *Drosophila* la sobreexpresión de la forma represora de CREB bloquea la formación de la memoria de largo plazo (Yin et al., 1994), mientras que la sobreexpresión de la forma activadora de CREB reduce ampliamente el número de ensayos requeridos para establecer una memoria de largo plazo (Yin et al., 1995).

Se ha reportado que la interrupción de las proteínas G estimuladoras (G_s) en la estructura denominada cuerpo en forma de seta de *Drosophila* interrumpe completamente el aprendizaje, pero no en otras regiones (Connolly et al., 1996).

También se ha encontrado, en moscas transgénicas, que cuando se induce la expresión de un péptido inhibidor de la CaMKII se presentan serias deficiencias de aprendizaje (Griffith et al., 1993).

En las moscas mutantes y transgénicas, la identificación deficiencias de aprendizaje se asegura midiendo la habilidad de percibir las señales (estímulo condicionado), los reforzadores (estímulo incondicionado) y la ejecución de la conducta. También se observa si la mosca es normal morfológica y conductualmente, y si la anomalía está relacionada a las deficiencias de aprendizaje (Waddell y Quinn, 2001).

Mecanismos moleculares de la potenciación a largo plazo

La potenciación a largo plazo (LTP) es una forma de modificación sináptica (incremento de la eficiencia) persistente dependiente de la actividad que puede ser inducida por una estimulación breve de alta frecuencia de las neuronas del hipocampo (estructura crítica para las formas de aprendizaje explícitas) y se considera que podría ser al uno de los mecanismos celulares para el almacenamiento de la memoria explícita, el cual comparte algunos de los mecanismos usados para la facilitación sináptica en *Aplysia* (Bailey et al., 1996).

La LTP tiene dos fases: la fase temprana de la LTP que requiere sólo la modificación covalente de proteínas preexistentes y es producida mediante un solo tren de estímulos eléctricos y dura de 1 a 3 horas, y la fase tardía que es dependiente de la síntesis de nuevas proteínas y RNA, y se produce mediante trenes repetidos de estímulos eléctricos y produce el crecimiento de nuevas sinapsis (Bailey et al., 1996). Esta última fase puede ser activada mediante cAMP. El estudio de los genes tempranos inducidos por la LTP mostró genes que contienen el elemento CRE en su región reguladora: el activador plasminógeno de tejidos (tPA), que es una enzima que se ha encontrado que estimula el crecimiento de terminales axónicas y espinas dendríticas, el BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) y otro gen relacionado al gen C/EBP (proteína de unión al aumentador CCAAT) de *Aplysia* que es crítico para que ocurra la facilitación a largo plazo en ese animal (Squire y Kandel, 2000). Se ha propuesto que la fase temprana del LTP involucra la activación en la célula postsináptica de varias protein-cinasas no relacionadas a PKA, como la protein-cinasa II dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII), PKC y la tirosin cinasa fyn. Estas

proteínas pueden fosforilar proteínas blanco activándolas o desactivándolas, y entre otras cosas inducen la inserción de nuevos receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico) y un incremento en la sensibilidad a su neurotransmisor (glutamato), y además la síntesis de mensajeros retrógrados (NO) que actúan sobre la presinapsis facilitando la liberación de neurotransmisor. En la fase tardía del LTP se disparan los niveles de cAMP y este incremento activa a PKA, a las MAPK's (proteín cinasas activadas por mitógeno) y a CREB1. Al igual que en *Drosophila* y en *Aplysia* la actividad de CREB1 permite la activación de un juego de genes tempranos y estos genes actúan para iniciar el crecimiento de nuevos sitios sinápticos (Fig. 1). A pesar de las diferencias entre las formas de memoria declarativas y no declarativas en términos de comportamiento hay un grado sorprendente de similitud en los mecanismos elementales de almacenamiento (Squire y Kandel, 2000; Kandel, 2001).

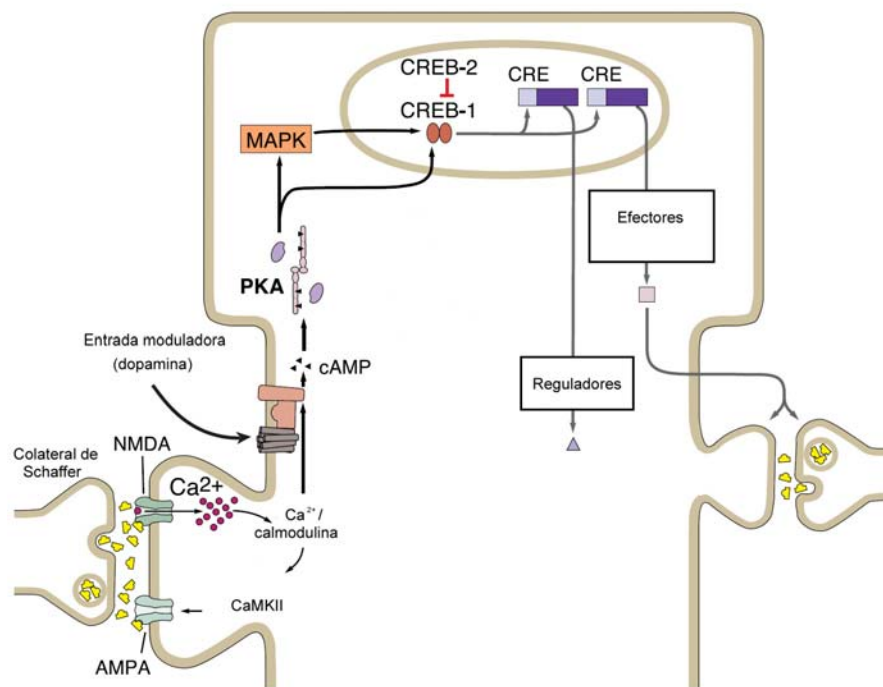


Fig. 1. Modelo de la LTP en la vía de la colateral de Schaffer. Un tren de potenciales de acción inicia la LTP temprana mediante la activación de los receptores a NMDA, influjo de Ca^{2+} en la célula postsináptica, y la activación de un grupo de segundos mensajeros. Con trenes repetidos de potenciales de acción, el influjo de Ca^{2+} recluta la adenilato ciclasa (AC), la cual activa la protein cinasa dependiente de cAMP. La cinasa es transportada hacia el núcleo donde fosforila CREB. CREB a su vez activa blancos que se piensa conducen a cambios estructurales. La AC también puede ser modulada por señales de dopamina e incluso otras aferencias moduladoras. Adicionalmente existen restricciones (en rojo) que inhiben la LTP tardía (modificado de Kandel, 2001).

Mecanismos moleculares de la memoria en vertebrados

En los vertebrados, la vía cAMP-PKA-CREB también participa en el almacenamiento de la memoria de largo plazo. En pollos, se previene la formación de la memoria de largo plazo por la inhibición de la adenilato ciclasa, o la administración de agentes que inhiben la PKA (Rosenzweig, 1996).

Bernabeu y cols. (1997), han encontrado que la fase tardía de la consolidación de la memoria de un aprendizaje de EI en rata es regulada por una vía de señalización de cAMP en el hipocampo activada al menos en parte por receptores dopaminérgicos, ya que la administración de un agonista dopaminérgico (SKF38393) después del entrenamiento mejoró la retención. En contraste el antagonista (SCH23390) produjo amnesia. El activador de la adenilato ciclasa (forskolina) o el 8Br-cAMP también mejoraron la memoria, y un inhibidor de la PKA (KT5720) obstaculizó la consolidación de la memoria. Las ratas sometidas al entrenamiento de evitación inhibitoria mostraron un aumento en la capacidad de unir agonistas específicos a dopamina y en los niveles endógenos de cAMP, un incremento en la actividad de la PKA y en la inmunoreactividad a pCREB (forma fosforilada de CREB).

También se ha encontrado que el entrenamiento en una tarea de EI va seguido por dos picos de actividad de PKA dependientes de cAMP en el área hipocámpica CA1 de rata. El segundo pico parece depender del primero, ya que la inhibición del primero con un inhibidor de la PKA (Rp-cAMPS) cancela ambos picos. Además la memoria de largo plazo de esta tarea depende de ambos picos, ya que la inhibición de cualquiera de ellos mediante la administración de Rp-cAMPS bloqueó la memoria de largo plazo. El efecto amnésico no se observó cuando el inhibidor de la PKA se administró en un tiempo intermedio entre los dos picos (Vianna et al., 2000a).

Finalmente, la infusión intrahipocámpica de oligodesoxinucleótidos antisentido contra el RNAm de CREB administrados antes del entrenamiento en una tarea de aprendizaje produjo un daño significativo en la memoria de largo plazo. Este efecto no se observó en los controles que recibieron buffer u oligodesoxinucleótidos con la misma composición de bases pero en orden aleatorio. Tampoco cuando se administraron los oligonucleótidos antisentido un día después del entrenamiento. La adquisición de la tarea y

la memoria de corto plazo fueron similares entre el grupo experimental y los controles (Guzowski y McGaugh, 1997).

Otras protein cinasas como las MAPK, CaMKII, PKC, PI3K (fosfatidilinositol-3-cinasa), PKB (protein cinasa B) también parecen participar en el almacenamiento de la memoria y los datos indican que en algunas de ellas podrían interactuar con la vía cAMP-PKA-CREB.

Se ha mostrado que el nivel de pCREB y el de la subunidad catalítica de PKA nuclear en el hipocampo incrementan después del entrenamiento de ratas en una tarea de EI. Estos cambios van acompañados de la activación de las MAPK's p44 y p42 y el subsecuente incremento en la fosforilación del factor de transcripción Elk-1 y en la producción de Fos. La activación hipocampal de MAPKs, CREB, Elk-1 y Fos asociada al aprendizaje fue abolida en animales entrenados por la microinyección bilateral de AP5 (ácido 2-amino-5-fosfono pentanoico; bloqueador selectivo de receptores glutamatérgicos a NMDA) en la región CA1 del hipocampo dorsal inmediatamente después del entrenamiento (Cammarota et al., 2000).

Se ha reportado que la administración postentrenamiento del inhibidor específico de las cinasas de las MAPK (PD098059) produce amnesia cuando se administra en el hipocampo dorsal, la amígdala, y en las cortezas entorrinal y parietal. Sin embargo, hay diferencias en las ventanas temporales en las que se produce dicho efecto entre estas estructuras cerebrales. Estos resultados sugieren un papel de la cascada de MAPK en el procesamiento de la memoria después del entrenamiento de una forma dependiente del tiempo, que es diferente entre las estructuras estudiadas (Walz et al., 2000a).

Empleando el inhibidor de la MAPK c-Jun amino terminal cinasa (JNK) conocido como SP600125 en la región CA1 del hipocampo dorsal en dosis que reducen significativamente la fosforilación de c-Jun sin afectar la actividad de ERK 1/2 (cinasa regulada por señal extracelular 1/2) o p38 (pertenecientes a las otras dos subfamilias de las MAPK) se mejoró la memoria de corto plazo, pero se bloqueó la formación y retención de la memoria del aprendizaje de una tarea de evitación inhibitoria (Bevilaqua et al., 2003)

Se ha reportado que la exposición de ratas a un ambiente novedoso (campo abierto) después del entrenamiento en una tarea de EI, obstaculiza la formación de la memoria de largo plazo y el incremento de la forma fosforilada de CREB en el hipocampo. La administración del activador de la PKA Sp-adenosina 3',5' monofosfotioato cíclico (Sp-cAMPS) en el hipocampo después del entrenamiento incrementó los niveles de pCREB, y restauró la memoria de largo plazo de esta tarea en ratas expuestas al estímulo novedoso. Adicionalmente la exposición al campo abierto antes del entrenamiento de evitación interfiere con el efecto amnésico de una segunda exposición postentrenamiento y restaura los niveles hipocampales de pCREB. En contraste la activación asociada al entrenamiento de las MAPK p42 y p44 en el hipocampo, no se altera por la novedad (Viola et al., 2000).

En ratón se ha encontrado que la expresión de una forma de CaMKII, que es activa de forma independiente de Ca^{2+} , afecta el aprendizaje del laberinto espacial de Barnes cuando se expresa en el hipocampo; y cuando se expresa en altos niveles en el estriado o amígdala, pero no en otras estructuras, afecta el aprendizaje de miedo condicionado (Mayford et al., 1996). Mutaciones homocigóticas de α -CaMKII interrumpen el aprendizaje espacial en ratones (Silva et al., 1992). En ratas el aprendizaje de una tarea de EI, produce un incremento rápido y reversible de la actividad hipocampal de CaMKII (Camarotta et al., 1998), mientras que la inhibición farmacológica de esta cinasa con KN-62 causa amnesia retrógrada completa sólo cuando se da inmediatamente después de la sesión de adquisición (Wolfman et al., 1994). El entrenamiento en el laberinto acuático de Morris induce la activación de la CaMKII en el hipocampo de rata (Tan y Liang, 1996). De la misma forma la EI en pollos induce la autofosforilación de CaKMII en el hiperestriado ventral medial y el lóbulo paraolfatorio (Zhao et al., 1999).

La administración en el hipocampo dorsal de inhibidores de la PKC (staurosporin y CGP41231) provocaron amnesia retrograda completa en la retención de una tarea de EI cuando se administraron dentro de los primeros 30 min después del entrenamiento, (Jerusalinsky et al., 1994).

Se ha encontrado que las vías de señalización de la PI3K (cinasa activada por ras) y su blanco AKT (proteín cinasa del retrovirus transformante AKT8) conocido también como

PKB contribuyen a la LTP, y a la consolidación del miedo condicionado, dependiente de amígdala (Sweatt, 2001).

En pollos, los agentes que inhiben las CaM cinasas previenen la formación de una memoria de plazo intermedio (de 15 a 60 min postentrenamiento), mientras que los agentes que no inhiben las CaM cinasas pero inhiben la PKC o la PKG (proteín cinasa G) previenen la formación de la memoria de largo plazo (Rosenzweig, 1996).

También se ha encontrado que pudiera haber diferencias entre los diferentes tipos de aprendizaje en cuanto a los eventos moleculares que desencadenan. La inhibición de CaMKII en el hipocampo después del entrenamiento interrumpe la habituación a un ambiente nuevo, mientras que la inhibición de otras cascadas de señalización cruciales para varias tareas asociativas dependientes del hipocampo como las mediadas por la activación de PKA, ERK1 o PKC no tuvieron efecto en la memoria de largo plazo de la habituación (Izquierdo et al., 1992; Vianna et al., 2000b).

Se ha reportado que el AP5, un antagonista de los receptores de NMDA, el Rp-cAMP, inhibidor de la PKA, el SCH23390, antagonista del receptor dopaminérgico D1, el KN-62, inhibidor de la CaMKII, y el PD098059, inhibidor de MAPK's, afectan fuertemente la memoria de una tarea de evitación inhibitoria cuando se inyectan intrahipocampalmente. Para una tarea de habituación el KN-62 produjo amnesia, pero ninguno de los demás tratamientos tuvo efecto alguno sobre la retención de esta tarea (Vianna et al., 2001).

La actividad de desfosforilación (opuesta a la de las cinasas) también desempeña un lugar en la memoria. Se encontró en ratón que la inhibición de la fosfatasa calcineurina (mediante la inducción reversible de una proteína inhibidora específica en un sistema de expresión activado por doxiciclina) produce un aumento en el aprendizaje y en la fuerza de la memoria de corto y de largo plazo en varias tareas espaciales y no espaciales dependientes de hipocampo y en tareas no espaciales, así como una facilitación de la LTP *in vitro* e *in vivo*. Las mejoras en la LTP y en la memoria se revierten completamente mediante la supresión de la expresión del transgen (Malleret et al., 2001).

En congruencia con lo reportado en *Aplysia*, *Drosophila* y la LTP, los datos en vertebrados indican que la consolidación de la memoria requiere de síntesis de RNAm y proteínas, ya que su inhibición en estructuras cerebrales que participan en la formación de la memoria para diferentes tareas, produce deterioros en la memoria de largo plazo.

Por ejemplo, se ha reportado que la infusión de anisomicina (inhibidor de la síntesis de proteínas) produce efecto amnésico en una tarea de EI cuando es administrado en el hipocampo en dos períodos críticos, alrededor del momento de entrenamiento (15 min antes) y 3 h después, sin embargo el efecto amnésico desaparece cuando se da un entrenamiento previo de evitación inhibitoria con una intensidad de choque baja que por si mismo no altera las latencias de retención, no así la sola preexposición al aparato de entrenamiento, sugiriendo que aun en ausencia de cambios conductuales el preentrenamiento con intensidad baja pudo haber inducido cambios plásticos permanentes a nivel celular dependientes de la síntesis de proteínas (Quevedo et al., 1999).

También se ha mostrado que la inhibición de la síntesis de proteínas en el núcleo accumbens impide la consolidación de una tarea instrumental apetitiva (presión de palanca por alimento) en ratas. Las ratas fueron entrenadas en una sesión diaria de 15 min durante 7 días, y durante los primeros 5 días se administró anisomicina inmediatamente después de la sesión de entrenamiento (Hernandez et al., 2002).

Igaz y cols. (2002) han encontrado que la formación de la memoria de largo plazo de una tarea de EI en ratas también depende de dos periodos que requieren la síntesis de nuevos RNAm en la región CA1 del hipocampo dorsal. El primer período alrededor del tiempo de entrenamiento (-15 min ó 0 min), y el segundo de 3-6 h después del entrenamiento. Estos dos períodos de sensibilidad a los inhibidores transcripcionales (de la RNA polimerasa II) 5,6-dicloro-1-beta-d-ribofuranosilbenzimidazol (DRB) o alfa-amanitina son similares a aquellos observados usando el inhibidor de la síntesis de proteínas anisomicina.

En pollos se ha sugerido que hay un tipo de memoria intermedia que dura unas cuantas horas que involucra una primera ola de síntesis de glicoproteínas, mientras que una memoria de largo plazo de mayor duración que requiere una segunda ola de síntesis de glicoproteínas que ocurre 6 horas después del entrenamiento (Rosenzweig, 1996). Freeman y cols. han reportado que la administración de anisomicina (antibiótico inhibidor de la

síntesis de proteínas) 0.5 h preentrenamiento, 1.5 horas postentrenamiento, así como entre 4-5 h postentrenamiento en una tarea de evitación pasiva impide la retención 24 h después, no así cuando la administración ocurre en tiempos intermedios, o posteriores a los mencionados (Freeman et al., 1995).

La requerimiento de la síntesis de RNAm y proteínas para el almacenamiento de la memoria de largo plazo podría ser explicada por la participación de las proteínas codificadas por los genes expresados después de la experiencia de aprendizaje en cambios estructurales como los que ocurren en la facilitación a largo plazo en *Aplysia*. La estabilidad de la facilitación de largo plazo parece depender de la persistencia de estos cambios estructurales en las sinapsis (Bailey et al., 1996). En congruencia con esta noción, en ratas se ha encontrado una correlación entre el aprendizaje y los genes tempranos, en particular un rápido y transitorio incremento en los niveles de RNAm de los genes Arc, zif268 y c-Fos en el hipocampo dorsal por la tarea espacial de laberinto acuático, así como también algunas diferencias en la corteza entorrinal y en la corteza visual primaria (Guzowski et al., 2001). Se ha encontrado también que la consolidación, pero no la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria requiere de la expresión del factor de transcripción C/EPB β en el hipocampo, e incluso que en la misma región la síntesis de proteínas de novo no es esencial para la memoria (Taubenfeld et al., 2001).

En un modelo de plasticidad sináptica inducido con ácido kaínico, se analizaron los genes que fueron modificados de manera transcripcional por hibridación substractiva, de éstos se escogieron 21 para determinar por hibridación “*in situ*” si el miedo condicionado (condicionamiento clásico) también producía cambios en los transcritos de estos genes. Encontraron que genes tempranos (c-fos y zif268) fueron inducidos rápidamente después del condicionamiento (0-1h) y regresaron a niveles basales en 2h. Algunos genes que codifican para proteínas estructurales como los neurofilamentos de cadena ligera (NF-1) y otros genes como la proteína de estabilización del receptor a NMDA y actina alcanzaron su expresión pico de 1-4 h después, y otros genes como el de RC3/neurogranina y gephyrin disminuyeron durante este período. Todos los genes examinados regresaron a niveles basales después de 8 h. Estos cambios en la expresión de genes ocurrieron únicamente

cuando se presentaron el estímulo condicionado y el incondicionado de forma asociativa, y no después del estímulo incondicionado solo o no apareado. El miedo condicionado activó un juego similar de genes en áreas similares cuando el estímulo condicionado fue olfatorio o visual (Ressler et al., 2002).

En estudios realizados mediante microarreglos se ha determinado en mamíferos, que en el hipocampo se expresan diferencialmente a causa del aprendizaje en tareas de laberintos y de condicionamiento clásico, una variedad de genes que codifican para receptores, factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, moléculas de señalización intracelular, factores de regulación de la transcripción de DNA, y otras moléculas con funciones diversas o desconocidas (Luo et al., 2001; Cavallaro et al., 2001, Cavallaro et al., 2002, Donahue et al., 2002 y Leil et al., 2002).

En otros trabajos se confirma la relevancia en la consolidación de la memoria de algunas de las proteínas antes citadas como los factores de crecimiento y las moléculas de adhesión celular; las cuales están relacionadas con los cambios plásticos asociados al aprendizaje. Algunas de estas proteínas también parecen interactuar con las vías de señalización que regulan la expresión de genes.

Por ejemplo, el entrenamiento de pollos en una tarea de evitación inhibitoria en un ensayo produce en las horas subsiguientes la fosforilación de un sustrato de la PKC, la proteína B-50 también conocida como GAP-43 (proteína asociada al crecimiento-43), seguido de la expresión de genes tempranos (c-fos y c-jun), y un incremento en la síntesis de glicoproteínas pre y postsinápticas, incremento en la densidad de espinas dendríticas, sinapsis y número de vesículas sinápticas así como un incremento prolongado en el disparo neuronal, en diversas estructuras (Rose, 1991).

En ratones transgénicos se ha logrado un mejoramiento del aprendizaje en una tarea de laberinto reforzada positivamente después de la sobre expresión de la proteína de crecimiento GAP-43 que es sustrato axonal de la PKC, así como en la LTP en el hipocampo de este tipo de animales (Routtenberg et al., 2000). Las moléculas de adhesión de células nerviosas (NCAM) relacionadas con la formación sináptica son polisializadas en el hipocampo después del entrenamiento de los animales en tareas de aprendizaje espacial (Fox et al., 1995; O'Connel et al., 1997). Incluso se ha reportado que esa polisialización de

las NCAM es necesaria para la ejecución adecuada en una tarea espacial y para la LTP (Becker et al., 1996).

Estos resultados concuerdan con la demostración de un incremento de las terminales de las fibras musgosas en el estrato oriens del área CA3 del hipocampo a consecuencia del entrenamiento en el laberinto espacial de Morris durante 3 días (Ramírez-Amaya et al., 1999).

Las infusiones bilaterales de anticuerpos anti-BDNF en el hipocampo dorsal produjeron una disminución en la activación de ERK2 y CREB; así como deterioro en la MLP. La inhibición de la activación de ERK 1/2 por PD098059 produjo efectos similares y también redujo la fosforilación de CREB. Por otra parte, la administración intrahipocampal de BDNF recombinante humano incrementó la activación de ERK1/2 y CREB; así como facilitación de la memoria de largo plazo. Los tratamientos con anti-BDNF o BDNF no afectaron la activación de isoformas de PKC, AKT y PKA, sugiriendo que el BDNF ejerce su función en la formación de la memoria de largo plazo en el hipocampo al menos en parte mediante la activación de CREB (Alonso et al., 2002).

La administración en el hipocampo dorsal de NGF (factor de crecimiento de nervios) produjo mejoría de la memoria de largo plazo un una tarea de EI cuando se administró a 0 y 120 min postentrenamiento. Dicha mejoría fue acompañada de un aumento en la actividad de MAPK en el hipocampo 30 min después de la inyección (Walz et al., 2000b).

Perspectiva general de los mecanismos moleculares de la memoria.

Los estudios en invertebrados (*Drosophila* y *Aplysia*) y vertebrados (LTP, memoria en pollo, rata y ratón) indican que la consolidación de la memoria involucra la activación de la vía cAMP-PKA-CREB, de otras cinasas como las MAPK, CaMKII, PKC, PI3K, PKB y que podrían haber interacciones entre ellas. La activación de estas vías de señalización parece controlar la expresión de genes tempranos y tardíos dentro de los que se encuentran factores de transcripción, de crecimiento y de adhesión celular, receptores y moléculas de señalización intracelular. Esto podría explicar porque la consolidación de la memoria y los fenómenos como la LTP y la facilitación sináptica en *Aplysia* dependen de la síntesis de RNAm y proteínas.

2.7 Papel del neostriado en procesos de memoria y aprendizaje

Se considera que en su expresión más amplia la memoria debe estar distribuida de manera difusa en muchas áreas del cerebro. Una de estas estructuras, el núcleo caudado o neostriado, ha sido estudiado exhaustivamente. Gran cantidad de trabajos han mostrado la participación del estriado en los procesos de memoria. Se ha demostrado que la interferencia con la actividad normal del estriado produce una deficiencia significativa en casi todos los tipos de respuestas condicionadas que se han estudiado. Dicha interferencia se ha inducido utilizando una diversidad de técnicas de lesión (Divac y Oberg, 1979; Dunnet e Iversen, 1981; Glick y Greenstein, 1973; Kirkby y Kimble, 1968; Mitcham y Thomas, 1972; Sanberg et al., 1979; Sandberg et al., 1984; Winocur, 1974), así como otros métodos que interfieren con la actividad electrofisiológica de la estructura, tales como la estimulación eléctrica y la aplicación de cloruro de potasio (Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín, 1979; Prado-Alcalá et al., 1973, 1975, 1980; Wyers y Deadwyler, 1971; Wyers et al., 1973).

Aunque esos estudios indicaban que el funcionamiento normal del estriado es necesario para el establecimiento de la memoria, no dieron evidencias acerca de los mecanismos implicados en tal función; sin embargo sentaron las bases experimentales para estudios tendientes a determinar los eventos neuroquímicos que podrían ocurrir durante el aprendizaje y la memoria. Por ejemplo se demostró que las alteraciones de la actividad dopaminérgica (Kim y Routtenberg, 1976; Fibiger et al., 1974; Staubli y Huston, 1978), GABAérgica (Salado-Castillo y Prado-Alcalá, 1987) y colinérgica (Haycock et al., 1973; Neill y Grossman, 1970; Prado-Alcalá et al., 1972) estriatales también producen deficiencias mnémicas.

Dado que la dopamina, el GABA y la acetilcolina son los principales neurotransmisores que regulan la actividad del sistema nigroestriatal, algunos datos experimentales sugirieron que este sistema está críticamente involucrado en los procesos de los que depende el establecimiento de la memoria. Así, el bloqueo de la actividad GABAérgica de la sustancia nigra (Cobos-Zapíaín et al., 1996; Kim y Routtenberg, 1976) y el tratamiento combinado de un bloqueador dopaminérgico con la aplicación intraestriatal de atropina (Rivas y Prado-Alcalá, 1985) producen amnesia.

La inyección de drogas anticolinérgicas en la región antero-dorsal del estriado produce un efecto amnésico en la adquisición y retención de tareas condicionadas instrumentales (Bermudez-Rattoni et al., 1986; Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín, 1977; Prado-Alcalá et al., 1972, 1980, 1981, Giordano y Prado-Alcalá, 1986). En contraste, no se encontraron deficiencias conductuales cuando los mismos tratamientos fueron administrados en otras regiones cerebrales, como los ventrículos laterales (Prado-Alcalá et al., 1972), la amígdala (Prado-Alcalá y Cobos-Zapíaín, 1977) o la corteza parietal (Bermúdez-Rattoni et al., 1986).

También se ha descrito que como consecuencia del entrenamiento de evitación inhibitoria hay un incremento en la síntesis de proteínas detectado como un incremento en la incorporación de (35 S) metionina (Alemán et al., 1982) y de receptores muscarínicos (Ortega et al., 1996) en el estriado.

En el neostriado se ha reportado que después del entrenamiento en diferentes tareas de aprendizaje se induce la fosforilación de CREB y la expresión de c-fos (Colombo 2004).

Sin embargo se sabe muy poco de los eventos moleculares que ocurren en esta estructura durante el aprendizaje y la memoria en comparación con otras estructuras como el hipocampo.

2.8 La tecnología de microarreglos.

Como se mencionó con anterioridad, se sabe que la memoria de largo plazo es bloqueada por inhibidores de la transcripción y la traducción, indicando que es dependiente de la expresión de genes de *novo*. Además que las proteínas sintetizadas durante la consolidación de la memoria pueden contribuir a reestructurar los procesos en la sinapsis y por lo tanto a reestructurar la transmisión sináptica mas allá de la duración de la memoria de corto plazo. Sin embargo para poder entender el proceso de consolidación de la memoria, es necesario obtener información sobre la identidad y especificidad de las proteínas requeridas. La cantidad de una proteína particular es reflejada frecuentemente por la abundancia de su RNAm, por lo tanto midiendo los cambios diferenciales de esta última, se pueden identificar las proteínas que posiblemente se requieren (Cavallaro et al., 2001).

Los microarreglos de DNA sirven como una herramienta que permite cuantificar la abundancia del RNAm de cientos o miles de genes en modo paralelo a diferencia de otras metodologías tradicionales. Un microarreglo de DNA consiste de una cuadrícula sobre un material de soporte, en la cual dentro de cada uno de los cuadros que la componen hay una secuencia de DNA único. Cada una de las secuencias de DNA en el microarreglo corresponde a un RNAm particular. El RNAm o total de las muestras sirve de molde para sintetizar un DNA complementario marcado (por ejemplo con nucleótidos radioactivos) que se hibrida al microarreglo. La intensidad de la marca en cada elemento del microarreglo es proporcional a la abundancia en la muestra del RNAm correspondiente (Cavallaro et al.,2002)

Sin embargo, a pesar de las ventajas de los microarreglos, es ampliamente reconocido que hay una variabilidad de los resultados que se obtienen entre diferentes laboratorios, usuarios y plataformas. Esto es debido a la variabilidad biológica y a los artefactos introducidos en cada una de las etapas de la técnica. Además su rango dinámico lineal es reducido, este se refiere al intervalo en el cual la intensidad de la señal de hibridación guarda una proporcional lineal con la abundancia del RNAm. Por lo anterior, los microarreglos deben considerarse una herramienta de tamizaje inicial y debe verificarse por métodos independientes que los genes de interés estén realmente expresados de forma diferencial y en que grado (Simon et al., 2002; Huang et al., 2001; Rajeevan et al., 2001; Hasslett et al., 2002; Petricoin et al., 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que el núcleo caudado es muy importante para la formación de la memoria de largo plazo e interviene en la evocación de la memoria. Sin embargo muy poco se sabe de los eventos moleculares que ocurren en él durante la consolidación de la memoria. A pesar de que algunos de los mecanismos de la consolidación de la memoria parecen estar conservados filogenéticamente, podrían haber diferencias entre estructuras en las moléculas que participan (Cavallaro et al., 2002b). La tecnología de microarreglos ha mostrado ser una valiosa herramienta para determinar la expresión diferencial de genes que ocurren durante la consolidación de la memoria, por lo que resulta de interés su uso en el neocórtex.

4. HIPÓTESIS

El entrenamiento de las ratas en una tarea de aprendizaje de evitación inhibitoria en un ensayo inducirá cambios detectables en la expresión de genes en el neocórtex 3 horas después de concluida la tarea.

5. OBJETIVOS

Determinar qué genes del neocórtex están involucrados en la consolidación de la memoria de largo plazo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Tarea de Aprendizaje

En virtud de que el objetivo de esta tesis fue determinar la posible inducción de genes en el estriado como consecuencia de la consolidación de la memoria, era de vital importancia definir una situación de aprendizaje en la que se pudieran descartar posibles cambios en la producción de genes asociados a otros factores como los estímulos sensoriales, la actividad motora o el estrés. Siendo este último posiblemente uno de los factores a controlar más importantes. Además la tarea debería ser aprendida en un solo ensayo para poder determinar el tiempo de inicio del proceso de consolidación de la memoria.

Para cumplir con este objetivo, parte de esta tesis se inició, precisamente, con la búsqueda de una tarea de aprendizaje que permitiera dissociar los efectos de la consolidación de la memoria, de aquellos que pudieran producirse por otros factores. Para ello, diseñamos y modificamos varios modelos conductuales, hasta que implementamos un diseño que nos permitió someter a la prueba experimental el objetivo propuesto (ver apéndice A).

La tarea de aprendizaje empleada fue la de evitación inhibitoria, en la cual aproximadamente 90% de los sujetos entrenados recuerdan la experiencia del entrenamiento cuando se mide la retención a las 24h (ver Apéndice A). Para poder estudiar los cambios en la expresión de genes que ocurren durante el proceso de consolidación esta característica se considera muy importante debido a que permite asumir que los animales entrenados aprendieron y se encontraban consolidando la tarea (al menos un alto porcentaje) en ausencia de posibilidad de probar la retención.

Aparatos.

Cámara de condicionamiento de evitación inhibitoria. El condicionamiento se llevó a cabo en una cámara de evitación inhibitoria (Fig. 2), que consta de dos compartimentos contruidos en acrílico rojo transparente que permite observar la conducta de los animales

mientras realizan la tarea; cada uno mide 30cm x 30cm x 30cm y están separados por una puerta tipo guillotina. El compartimiento de seguridad (A) se encuentra iluminado con un foco de 10 Watts adherido a la tapa, el piso lo forma una lámina de acrílico corrugado de color blanco. El compartimiento de castigo (B), es oscuro, el piso y las paredes lo forman dos láminas de acero que forman una “V” hacia el centro del piso, entre las cuales hay 1.5 cm de separación, mismas que pueden ser electrificadas por encontrarse conectadas a un estimulador de pulsos cuadrados, conectado a una unidad de corriente constante. La cámara de condicionamiento estuvo localizada en un cuarto sonoamortiguado y oscuro provisto de un enmascarador de ruido.

El choque producido por el estimulador fue de 1.0 mA, con pulsos de 50 ms, frecuencia de 10 pulsos por s y un tren de 10 s de duración.

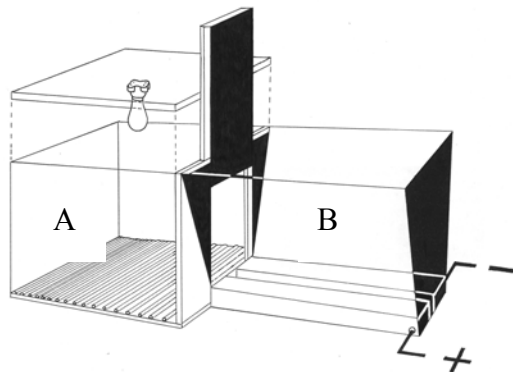


Fig. 2 Cámara de evitación inhibitoria

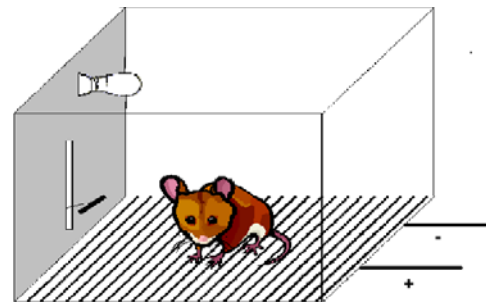


Fig. 3 Cámara de Choque

Cámara de Choque. Consiste en una caja de acrílico transparente de 25cm de ancho, 30cm de largo y 28 cm de altura, el piso lo forma una rejilla de tubos de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separados por una distancia de 1.5cm de centro a centro, los cuales pueden ser electrificados con el mismo estimulador usado para la cámara de evitación inhibitoria (Fig. 3). Esta cámara está localizada en un cuarto sonoamortiguado diferente del de la cámara de evitación inhibitoria.

Procedimiento.

La primera parte del procedimiento consistió en la manipulación de los animales (3 a 5 min diarios) durante 2 días previos a la sesión de entrenamiento (adquisición), con el fin de facilitar el manejo de los animales.

La tarea de evitación inhibitoria consistió en introducir al animal en el compartimiento A de la cámara de evitación inhibitoria durante 10 s; una vez transcurridos se abrió la puerta y se registró el tiempo que tarda el animal en pasar al compartimiento B (latencia de entrada). Cuando el animal hubo pasado con las cuatro patas al compartimiento B se cerró la puerta y en ese instante se le administró un choque eléctrico de 1.0 mA durante 5 s; después se abrió la puerta manteniendo el choque encendido otros 5 s, y se le permitió escapar al compartimiento A, registrándose el tiempo transcurrido (latencia de escape); una vez que el animal escapó se le retuvo en el compartimiento A durante 30 s y después se regresó a su caja habitación y se dio por concluida la sesión.

En el día del entrenamiento se definieron 2 grupos, uno experimental y uno control. Se introdujo a las ratas ambos grupos a la cámara de choque, en la cual solo el grupo control recibió choque. Diez min después ambos grupos se entrenaron en la tarea de evitación inhibitoria (descrita anteriormente) pero sólo en el grupo experimental se aplicó el choque.

Las duraciones de choques administrada a cada una de las ratas control se apareó con la duración de los choques recibida por cada una de las ratas experimentales (5s más la latencia de escape).

El objetivo fue que los estímulos recibidos por ambos grupos fueran lo más parecidas entre sí pero que sólo el grupo experimental pudiera aprender la tarea, esto para homogenizar los posibles efectos sobre la expresión de genes estriatales debida a la aplicación del choque eléctrico, a la actividad motora desplegada por las ratas en la cámara de evitación inhibitoria. En otras palabras, este grupo fue sometido a los mismos estímulos y desarrolló la misma actividad motora que el grupo control, pero no estableció la asociación choque-respuesta necesaria para el aprendizaje y la subsecuente formación de la memoria. Además en este grupo la rejilla en el compartimiento A de la cámara de evitación

pasiva se cubrió con una placa de acrílico, para evitar que haya podido asociar la rejilla con el choque recibido en la cámara de choque.

El uso de una sola cámara para dar el choque a ambos grupos solo permitiría controlar el choque, pero no otros estímulos sensoriales ni la actividad motora. Además posiblemente no podría demostrarse conductualmente que el grupo control no aprende la tarea, ya que durante una sesión de retención estos animales podrían evitar entrar al sitio donde anteriormente recibieron el choque.

6.2 Disección

La disección se realizó en un cuarto a temperatura ambiente; las ratas fueron sacrificadas por decapitación con guillotina, después de lo cual el cerebro fue extraído cortando el cráneo por la parte media sagital superior.

Una vez obtenido el cerebro se realizó un corte coronal del cerebro en el punto donde se bifurca el nervio óptico. En el fragmento anterior se encontraron los dos neoestriados, separados entre sí por el septum y rodeados de corteza, por lo que se procedió a delimitar y extraer dichos núcleos. Los tejidos fueron colectados en tubos de 1.5 ml con 1ml de Trizol (Invitrogen) e inmediatamente homogenizados con una jeringa para insulina para inhibir la actividad RNAsa y guardados a -70°C hasta su proceso posterior.

6.3 Preparación del RNA

El RNA total fue aislado de un *pool* de núcleos caudados (10 ratas por grupo) mediante el método del trizol, tratado con DNAsa I y posteriormente purificado con el kit Rneasy mini (Qiagen).

A. Extracción de RNA total

Se juntaron los homogenados de cada grupo en tubos cónicos de 15ml. De cada tubo cónico se tomó un volumen de 3ml, que se repartió en 3 tubos de 1.5ml. Con cada tubo se siguió el procedimiento descrito por el fabricante. Este consiste en la extracción de RNA total con una mezcla de fenol, isotiocianato de guanidina y cloroformo a pH ácido, seguido por la sedimentación con isopropanol, lavado con etanol, después de lo cual se

juntaron los pellets correspondientes al mismo grupo en un solo tubo y se resuspendieron en agua libre de RNAsas. El RNA fue cuantificado por espectrofotometría.

B. Tratamiento del RNA total con RNAsa I

El RNA obtenido fue tratado con DNAsa I libre de RNAsa (Promega) para evitar la contaminación con DNA (1U para 10 µg de RNA) en un volumen final de 50 µl e incubado a 37°C por 30 min.

C. Purificación del RNA

El RNA tratado con DNAsa I fue purificado con el kit RNEasy mini (Qiagen) y para ello se diluyó en buffer RTL-ME (20 Vol de RTL-ME) y luego en un volumen de etanol al 70% para proporcionar las condiciones apropiadas para la unión del RNA a una membrana de silica-gel, posteriormente se lavó una vez con el buffer RW1 y 2 veces con el buffer RPE. Finalmente se eluyó con agua libre de RNAsas.

El RNA fue cuantificado por espectrofotometría y almacenado a -80°C.

D. Posteriormente se analizó el RNA por electroforesis en gel, colocando 1µg de RNA en un gel de formaldehído/agarosa/bromuro de etidio para corroborar la calidad del RNA.

E. A continuación el RNA se utilizó como templado en una reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con “primers” para el gen de actina. El RNA puede ser considerado como libre de contaminación con DNA genómico si no se observan bandas visibles en un gel de agarosa /Bromuro de etidio, después de 35 ciclos. En la reacción se incluyó una muestra con DNA como control positivo y una reacción empleando agua como control negativo.

F. Como una prueba complementaria para verificar la calidad del RNA y descartar la presencia de impurezas que pudieran inhibir a la transcriptasa reversa empleada en el ulterior procedimiento de síntesis de la sonda marcada radioactivamente, se realizó una reacción de RT-PCR para el gen de actina para los RNAs utilizados. La retrotranscripción

(RT) se llevo a cabo en un periodo de 60 min a 42 °C, con una etapa previa de 5 min a 65 °C para desnaturalizar estructuras secundarias, y otra final de 3 min a 94 °C para inactivar a la enzima transcriptasa reversa. El volumen de la mezcla de reacción fue de 25 µl conteniendo 5 µg de RNA total, 5 µl buffer 5 X (Tris-HCl 250 mM pH8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 50 mM), 200 nM de cada dNTP, 8 U de inhibidor de ribonucleasas RNasin (Promega), 400 nmol de un oligonucleótido iniciador dT y 50 U de enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). La reacción de PCR a partir de los productos de reacción de la RT se realizaron mediante el procedimiento arriba descrito.

6.4 Preparación de las sondas de cDNA

A. Síntesis de las sondas a partir del RNA total.

Para la síntesis de las sondas marcadas con ³²P se utilizó el kit Atlas Rat 1.2 II (Clontech). Para ello se hace la transcripción reversa de cada población de RNA usando una mezcla de “primers” específicos para cada gen. El RNA (2-5µg) junto con la mezcla de primers se incuban por 2 min a 70°C y luego otros 2 min a 50°C. Se completa la mezcla de reacción de 20µl conteniendo 4µl de Reaction Buffer (Tris-HCl 250mM pH 8.3, KCl 275mM, MgCl₂ 15mM) 2µl de 10X dNTP Mix (dCTP, dGTP, dTTP 5mM cada uno), 1µl de DTT (100mM), 5µl de [α-³²P] dATP (3000Ci/mmol, 10µCi/µl) y 2µl de MMLV-RT. Al final se detuvo la reacción agregando 10X Termination Mix (EDTA 0.1M pH 8.0, 1mg/ml de glicógeno) y se procedió a la cromatografía en columna.

B. Cromatografía en Columna

Para purificar el cDNA marcado de los nucleótidos no incorporados marcados con ³²P y fragmentos pequeños de cDNA (<0.1 kb) se utilizaron las columnas NucleoSpin (proporcionadas en el kit) y se agregó la sonda diluida con buffer NT2, se lavó 4 veces con el buffer NT3, se eluyó con buffer y la actividad de la sonda en un contador de centelleo. Las sondas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.5 Procedimiento de hibridación

Se empleó el filtro comercial AtlasTM Rat 1.2 Array II, el cual incluye 1176 cDNAs de rata

A. Prueba de hibridación a una membrana blanco.

Antes de hibridar las sondas marcadas de cDNA al Atlas Array, se revisó la calidad de cada sonda hibridándola a una membrana control de nylon (blanco). Esto para estimar el nivel de fondo inespecífico resultantes de las impurezas de las muestras de RNA.

B. Hibridación de las sondas de cDNA al Atlas Array

El Atlas array se colocó en una botella de hibridación a prehibridar por 30 min a 68°C en una solución de hibridación compuesta de 5ml de ExpressHyb y 0.5mg de DNA de testículos de salmón desnaturalizado por calor a 95-100°C. Se desnaturalizó la sonda agregando 10X denaturing solution (NaOH 1M, EDTA 10mM) e incubando a 68°C por 20 min. A la sonda desnaturalizada se agregó C₀t-1 DNA y 2X neutralizing solution (1M NaH₂PO₄ pH 7.0) y se incubó 10 min.

Se agregó la sonda a la solución de hibridación y se dejó en agitación continua a 68°C toda la noche. Al día siguiente se desechó la solución de hibridación y se realizaron cuatro lavados de 30 min en agitación continua a 68°C con Solución de Lavado 1 (2X SSC, 1% SDS) precalentada a la misma temperatura, un lavado de 30 min con Solución de Lavado 2 (0.1X SSC, 0.5 SDS) a 68°C y un lavado final de 5 min con agitación a temperatura ambiente con SSC 2X (NaCl 0.3M, Na₃Citrato•2H₂O 30 mM).

Inmediatamente se envolvió la membrana húmeda en un recipiente de plástico hermético y se expuso a la pantalla de “phosphorimaging” a temperatura ambiente. Esta pantalla fue leída después del tiempo de exposición en un “phosphoimager” (Molecular Dynamics, Storm 860).

C. Eliminación de las sondas de cDNA del Atlas Array.

Con la finalidad poder volver a usar la membrana en subsecuentes experimentos se eliminaron las sondas de cDNA radiomarcadas unidas a la misma. Las membranas se hirvieron por 5-10 min en SDS 0.5% y después de dejarse enfriar por 10 min se lavaron con Solución de Lavado 1 (2X SSC, 1% SDS). Después de verificar la eficiencia de la

eliminación de la sonda radiomarcada se colocó la membrana en un contenedor de hibridación para proceder con el siguiente experimento de hibridación. Alternativamente el Atlas Array fue sellado y almacenado en un envoltorio de plástico a -20°C hasta ser requerido.

El procedimiento de hibridación con el cDNA obtenido del RNA de los grupos Experimental y Control, descritos en el la tarea conductual se repitieron en tres ocasiones para asegurar la confiabilidad de los resultados de expresión diferencial de genes entre estos dos grupos.

6.6 Análisis de los microarreglos

Las imágenes de la hibridación obtenidas mediante el “phosphoimager” fueron analizadas para su cuantificación mediante el software ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics).

En el proceso de cuantificación de las señales de hibridación en la imagen se realizó la estimación de la señal de fondo (“background”) que es generalmente considerada necesaria para realizar la corrección de la señal de fondo. La motivación de esta corrección, es que la señal del spot incluye una contribución que no es debida a la hibridación específica de la sonda marcadas de cDNA a sus complementarios en las membranas. La finalidad es mejorar la precisión de la medición de la señal y reducir el sesgo (Yang et al., 2002a). La señal de fondo por lo general debe ser eliminada de la señal del “spot” para evitar que interfiera en la cuantificación de la expresión de los genes.

Para elegir el método más adecuado para la corrección de la señal de fondo se hizo un análisis gráfico de la distribución espacial de la señal de fondo con ayuda del software bioconductor para R (www.bioconductor.org). Dicha corrección se realizó con el software ImageQuant 5.0.

Antes de poder determinar si hubo expresión diferencial entre la condición control y la experimental, fue necesario tomar en consideración la variabilidad sistemática introducida durante el proceso de medición que pueden obscurecer las señales biológicas de

interés. La variabilidad en el proceso de medición se origina en las múltiples etapas de la adquisición de los datos, como en la manufactura de los microarreglos, la preparación del RNA de las muestras biológicas y la generación de las sondas marcadas, la hibridación, la digitalización de la imagen y el análisis de la misma. Aunque muchos de estos errores son comúnmente relativamente pequeños, los efectos combinados pueden ser significativos. Por lo tanto generalmente pueden esperarse variaciones en la expresión de un gen dado a lo largo de diferentes hibridaciones usando la misma muestra de RNA (Parmigiani et al., 2003; Dudoit et al., 2002).

Para remover los efectos de la variación sistemática, otras que la expresión diferencial se usa un proceso denominado normalización (Dudoit y Yang, 2003). Se asume que en promedio los genes no cambian su nivel de expresión en las muestras biológicas a ser probadas, y que la mayoría de los genes no son expresados diferencialmente o que gruesamente en conjunto los genes regulados a la alta y a la baja cancelan el efecto de la expresión. El término normalización en el sentido empleado aquí no implica la suposición de una distribución normal de los datos.

Sin embargo en algunos métodos de normalización como el empleado en este trabajo, los datos transformados a escala logarítmica para: 1) Para hacer que los datos se distribuyan más uniformemente a lo largo de los rangos de intensidad, 2) para que la distribución de los errores experimentales sean aproximadamente normales, 3) para que la distribución de las intensidades tengan una forma aproximada de campana.

Los datos fueron normalizados con los paquetes de software Bioconductor para R (www.bioconductor.org) de acuerdo al método propuesto por Dudoit y Yang (2003) y también se realizó en análisis gráfico con las gráficas diagnosticas propuestas por ellos de los datos antes y después de la normalización para determinar si se corrigieron las fuentes de variabilidad sistemática.

Con los datos normalizados, se seleccionaron arbitrariamente aquellos genes cuyo cambio en el nivel de expresión fuera igual o superior a 1.5 veces (que corresponde a un incremento o disminución de mas del 75% en la expresión) y que dicho cambio fuera consistente en los 3 experimentos.

7. RESULTADOS

Preparación del RNA

La cantidad del RNA total extraído de los estriados experimental (E) y control (C) de los 3 experimentos fue adecuada para la síntesis del cDNA radiomarcado (Tabla 1), y la calidad fue buena ya que no se ve degradado tal como muestra en la siguiente imagen (Fig. 4), en donde se observan las bandas en gel de agarosa al 1% incorporadas con bromuro de etidio (0.5µg/ml) correspondientes a los fragmentos 28S y 18S.

Experimento	Grupo	Concentración de RNA (µg/µl)
1	Experimental	0.8
	Control	2.08
2	Experimental	0.92
	Control	0.96
3	Experimental	0.81
	Control	0.64

Tabla1. Concentración del RNA total obtenido de los neostriados de los grupos controles y experimentales de los tres experimentos.

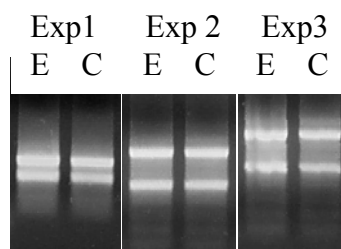


Fig 4. Electroforesis de RNA total en gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

RNA total extraído de los estriados experimental (E) y control (C) de los 3 experimentos se encuentra libre de contaminación con DNA genómico ya que no se produjo una banda visible en un gel de agarosa/bromuro de etidio después de 35 ciclos de una reacción de PCR para el gen de actina (ver Fig. 5) (carriles 1 y 2 para el RNA del experimento1; carriles 9 y 10 para el RNA del experimento2; carriles 13 y 14 para el RNA

del experimento 3) sin embargo el RNA es de la calidad suficiente para generar por retrotranscripción templados de cDNA para la PCR (carriles 3 y 4 para el RNA del experimento 1; carriles 7 y 8 para el RNA del experimento 2; carriles 11 y 12 para el RNA del experimento 3), los carriles 5 y 15 corresponden a controles negativos y los carriles 6 y 16 a controles positivos.

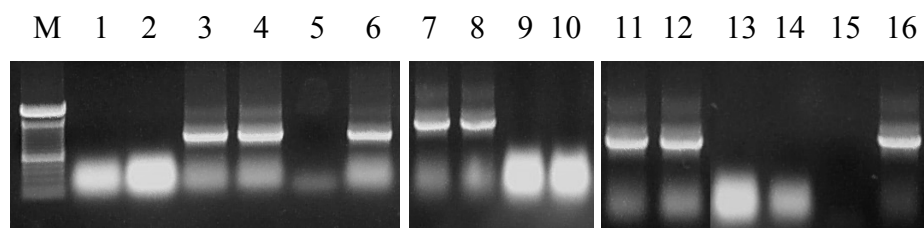


Fig 5. Electroforesis del producto de PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar actina, en gel de agarosa (1.2 %) con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml).

Hibridación en los microarreglos

En el primer experimento se observó que la hibridación de la sonda radiomarcada a las membranas tenía señales débiles (imagen no mostrada); esto pudo ser causado por una diversidad de factores. Dentro de los factores que influyen en el resultado final se encuentran la calidad del RNA, éste no debe estar degradado o contener impurezas que inhiban a la enzima que realiza la retrotranscripción, lo cual no parece ser el caso ya que las pruebas realizadas para verificar la calidad del RNA indican lo contrario. Adicionalmente, la medición en el contador de centelleo de la sonda purificada permite inferir que la sonda de cDNA fue sintetizada y el nucleótido radiomarcado se incorporó a las mismas, ya que la cantidad de radiación emitida por la sonda se encontró dentro del rango esperado de 2-10 X 10⁶ CPM. En parte la debilidad de las señales pudo ser debida a un bajo nivel de abundancia de las diferentes poblaciones de RNAm en el sistema experimental (tejido del núcleo estriado), por lo que para este experimento se volvieron a exponer las membranas a la pantalla de “phosphorimaging” durante 7 días en lugar de las 24 h usadas inicialmente (Fig. 6). En los experimentos subsecuentes se emplearon estos tiempos de exposición mas largos a la pantalla de phosphorimaging y adicionalmente se cambio el [α -³²P] dATP (3000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) por el mismo nucleótido con mayor actividad específica (6000

Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l). Estas modificaciones permitieron una mejoría en la intensidad de las señales de hibridación de las sondas marcadas a la membrana (Figs. 7,8,9).

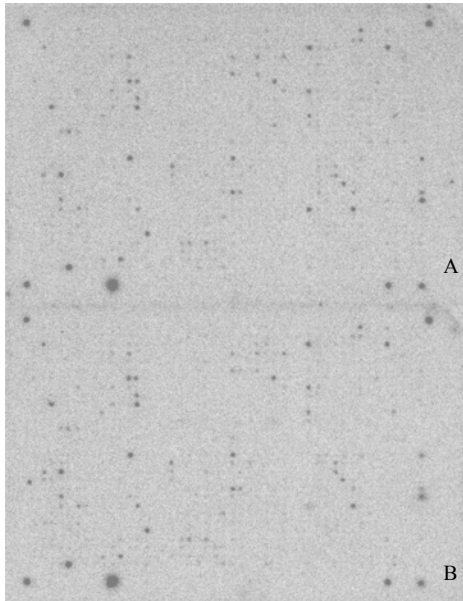


Fig. 6. Hibridación de las sondas marcadas con (α - 32 P) dATP, (3000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) del grupo control (A) y experimental (B) del experimento 1 en los microarreglos.

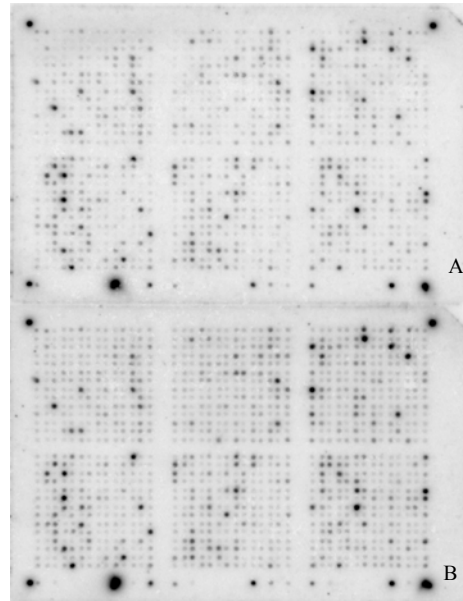


Fig. 7. Hibridación de las sondas marcadas con (α - 32 P) dATP, (6000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) del grupo control (A) y experimental (B) del experimento 2 en los microarreglos.

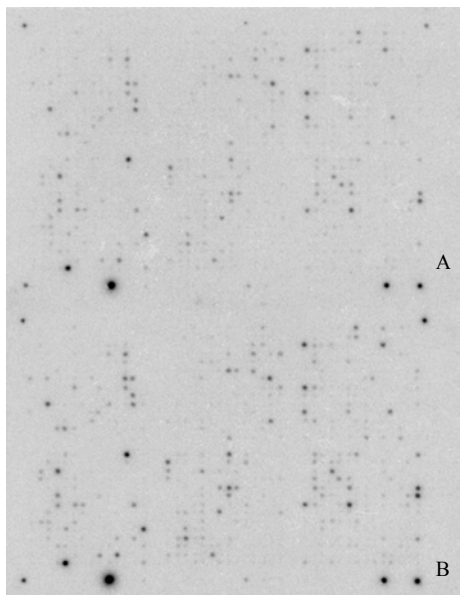


Fig. 8. Hibridación de las sondas marcadas con (α - 32 P) dATP, (6000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) del grupo control (A) y experimental (B) del experimento 3 en los microarreglos.

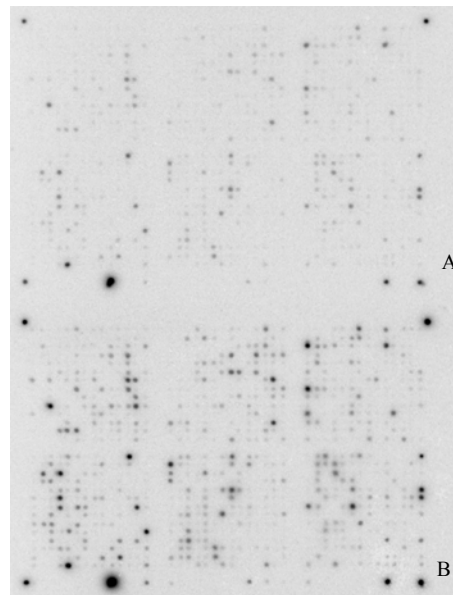


Fig. 9. Repetición de la hibridación de las sondas marcadas con (α - 32 P) dATP, (6000Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) del grupo control (A) y experimental (B) del experimento 3 en los microarreglos.

Análisis de los microarreglos

El análisis de los microarreglos consistió en varias etapas descritas en la metodología. Se analizaron las imágenes de las Figs. 6 a 9 y se cuantificaron las señales de hibridación de los microarreglos, posteriormente los datos fueron normalizados y se hicieron las comparaciones entre los niveles de expresión entre los grupos control y experimental.

Para la cuantificación de la expresión a partir de las imágenes obtenidas se eligió un método de corrección de la señal de fondo que utiliza la señal de fondo local, en lugar de métodos que corrigen para una señal de fondo global, ya que estas últimas asumen una señal de fondo homogénea. Como puede observarse en la representación gráfica de la distribución espacial de la señal de fondo en las membranas de los microarreglos de las condiciones control y experimental de los tres experimentos (Fig. 10), la señal de fondo no es homogénea en toda la membrana, y existen diferencias en la señal de fondo entre las condiciones control y las experimentales para los 3 experimentos que pueden introducir sesgos en la cuantificación.

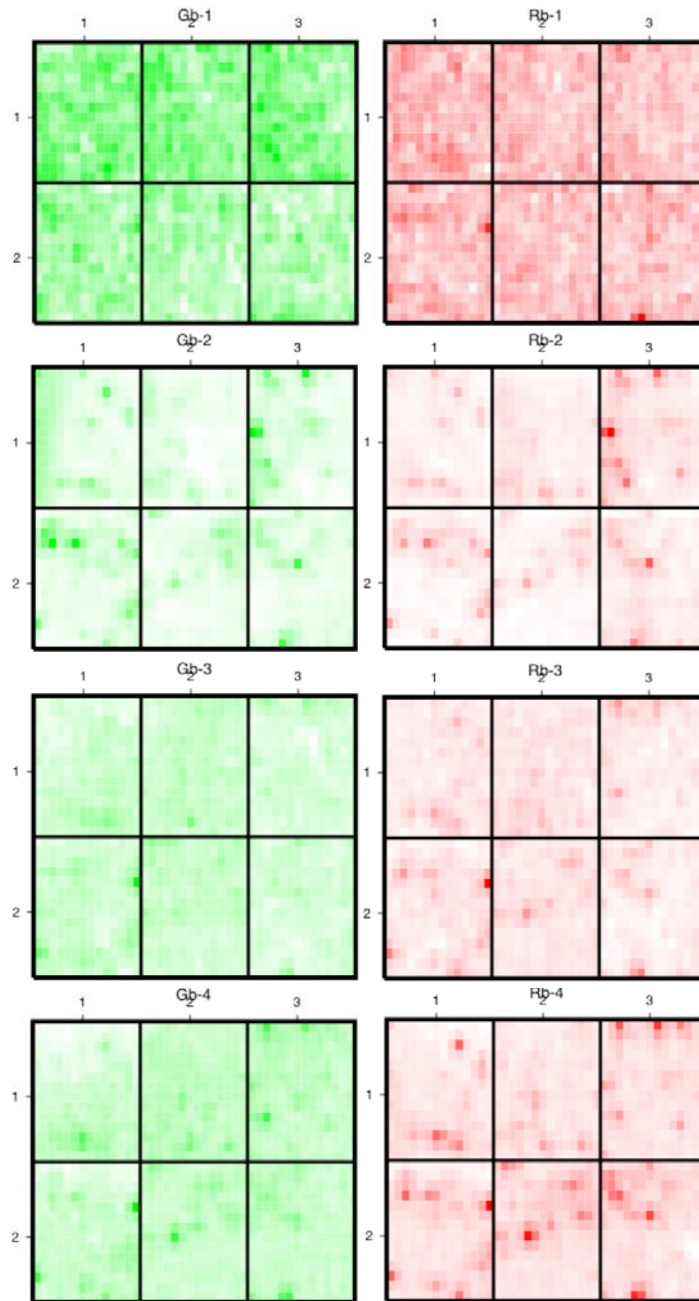


Fig. 10. Representación gráfica de distribución espacial de la señal de fondo (“background”) en los microarreglos. Gb1 (Experimento 1 condición control), Rb1 (Experimento 1 condición experimental), Gb2 (Experimento 2 condición control), Rb2 (Experimento 2 condición experimental), Gb3 (Experimento 3a condición control), Rb3 (Experimento 3b condición experimental), Gb4 (Experimento 3b condición control), Rb4 (Experimento3b condición experimental).

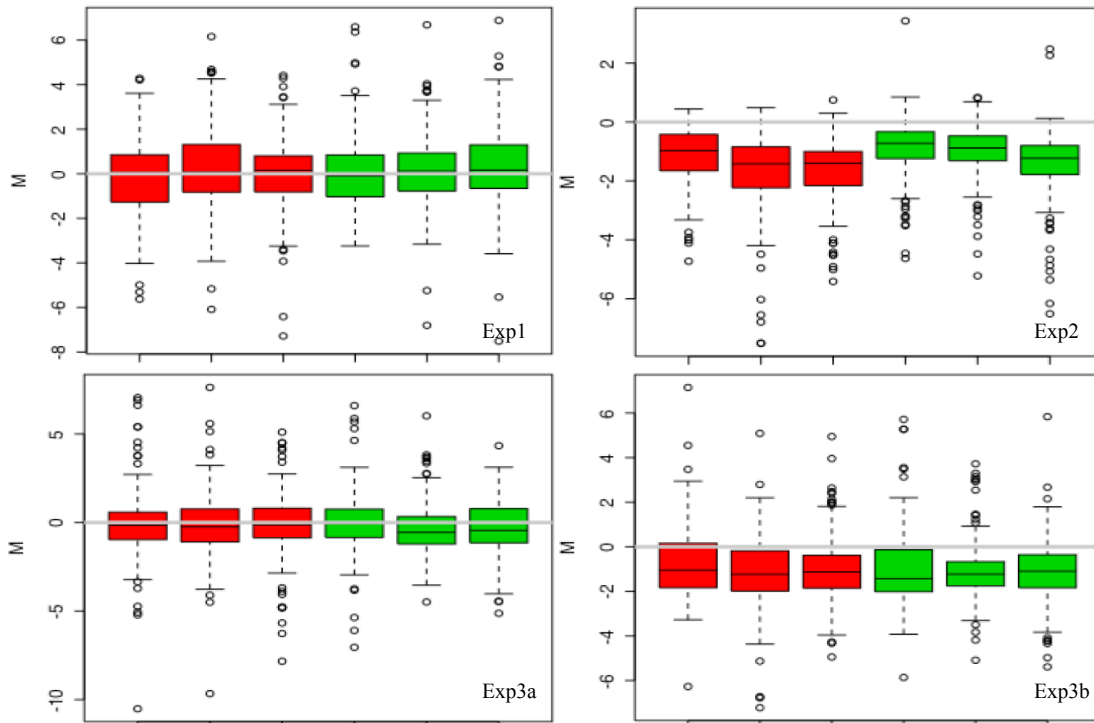


Fig. 11. Gráficas de caja de la distribución de los valores de M [$\text{Log}_2(\text{Experimental}/\text{Control})$] de los datos no normalizados agrupados para cada uno de los 6 sectores del microarreglo, en los 3 experimentos.

Dentro de las gráficas diagnósticas se encuentran aquellas de caja en las que pueden observarse diferencias sistemáticas (no debidas a diferencias de expresión) en la intensidad de la señal entre la membrana de la condición experimental y la de la condición control, así como diferencias espaciales en la distribución espacial relacionadas a impresión del microarreglo en la membrana.

En la Fig. 11 se muestran gráficas de caja para los experimentos del 1 al 3 (el 3 se hibridó por duplicado 3a y 3b). El eje X corresponde a cada uno de los seis sectores de la membrana del microarreglo (A,B,C,D,E,F) en los que se ubican los genes. En el eje Y se encuentra el del valor M ($M=\text{Log}_2(\text{Experimental}/\text{Control})$); que corresponde al logaritmo de base dos del cociente entre la cantidad expresión en la condición experimental y la expresión en la condición control para cada uno de los genes ubicado en el sector correspondiente. En la escala logarítmica de base2, un valor de $M=0$ equivale a no cambio en la expresión entre la condición experimental y la condición control.

Asumiendo que la mayor parte de los genes no cambian su expresión, la mediana de los datos de cada sector debería ubicarse en cero, y las desviaciones de la mediana de este punto pueden entonces atribuirse a diferencias sistemáticas entre el microarreglo de la condición control y la experimental diferentes de la expresión diferencial. Como puede observarse en la gráfica existen diferencias por sectores entre las medianas, y hay un desplazamiento global de dicha medida en las gráficas de los experimentos 2 y 3b de las medianas hacia valores de M negativos. Esto sugiere la presencia variación sistemática en la cuantificación de la expresión que es dependiente de la posición espacial, así variaciones sistemáticas globales entre las membranas en comparación.

En la Fig. 12, se muestran gráficas similares a las de la Fig. 11, pero con los datos normalizados. Como puede observarse se corrigen las diferencias sistemáticas dependientes de la distribución espacial, así como las globales en la cuantificación del nivel de expresión de los genes entre los microarreglos experimental y control para los tres experimentos.

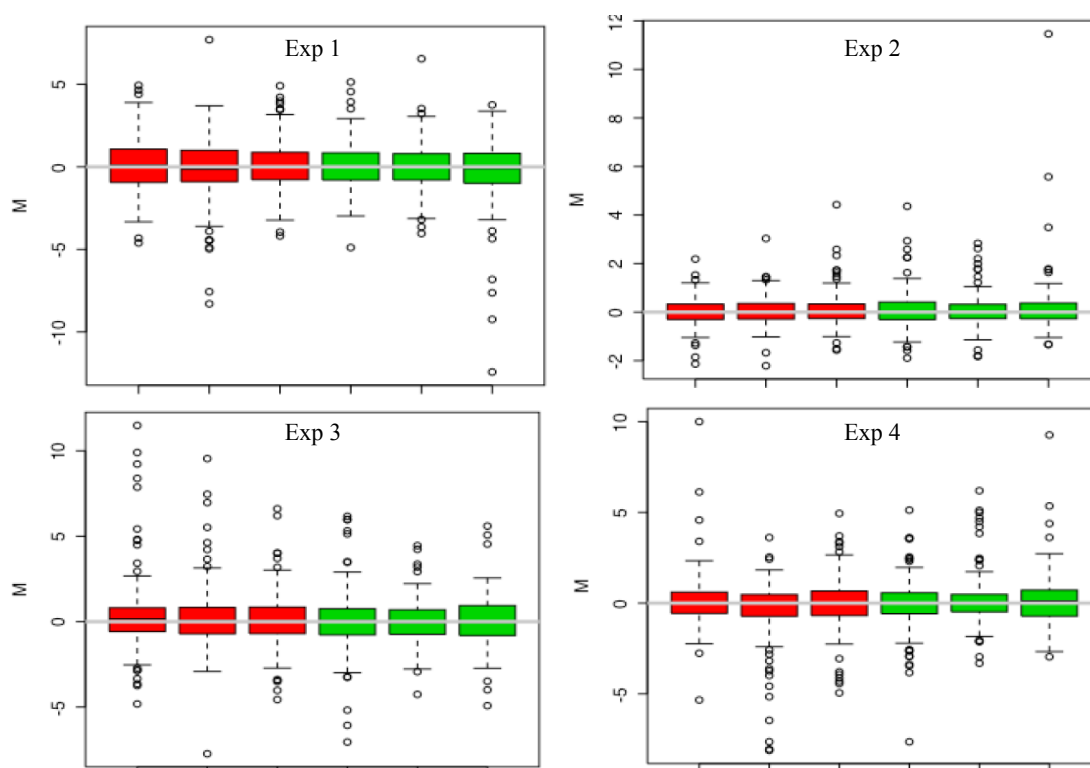


Fig. 12. Gráficas de caja de la distribución de los valores de M [Log_2 (Experimental/Control)] de los datos normalizados agrupados para cada uno de los 6 sectores del microarreglo, en los 3 experimentos.

Los datos de expresión son desplegados típicamente mediante gráficas de dispersión en las que se gráfica el logaritmo base 2 de la intensidad de la condición 1 versus la intensidad de la condición 2. Sin embargo se ha reportado que tales gráficas tienden a dar un sentido de concordancia poco realista entre la condición 1 y 2 y que pueden enmascarar algunas características relevantes de los datos. Una alternativa son las gráficas MA, las cuales son más reveladoras en términos de identificar artefactos y para propósitos de normalización (Dudoit y Yang 2003). Una gráfica MA, es una gráfica del cociente logarítmico de las dos intensidades de expresión, versus la media del logaritmo de la expresión de los dos.

En las gráficas de dispersión MA, puede observarse el efecto de la intensidad de la señal sobre los valores de M que representa la relación de cambio en la expresión entre las condiciones experimental y control. En el eje de las Y se encuentra el valor de M y en el eje de las X el valor A , que equivale a $(\text{Log}_2\text{Experimental} + \text{Log}_2\text{Control})/2$.

Como puede observarse en las gráficas MA de los datos no normalizados agrupados por sector en el microarreglo, existen sesgos en los cocientes dependientes de la intensidad, en el experimento 2 (Fig.13), estos se corrigen después de la normalización (Fig. 14).

La silueta en forma de “cola de pescado” de las gráficas MA de las Figs. 13 y 14 indican una creciente variabilidad de los cocientes conforme la intensidad de la señal es menor, resultando en cocientes más extremos conforme nos acercamos a niveles de intensidad de la señal de hibridación cercanos a la señal de fondo. Sin embargo, en conjunto las gráficas diagnósticas indican que la normalización es aceptable.

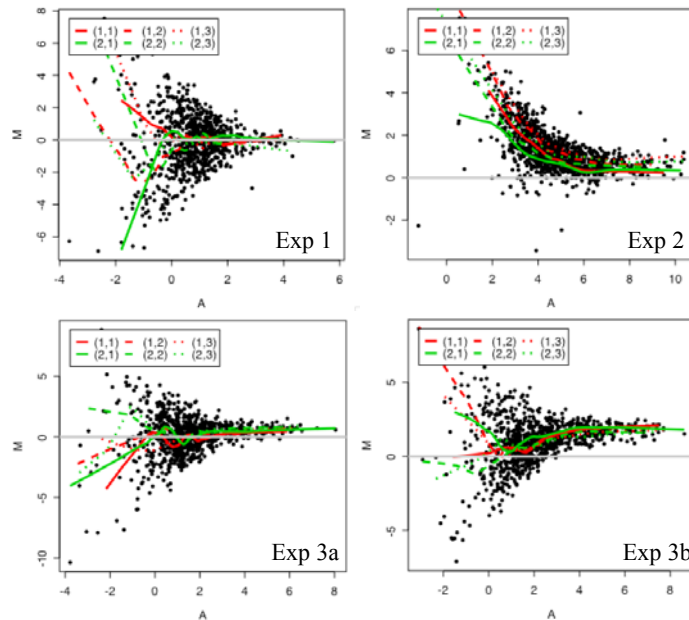


Fig. 13. Gráfica de dispersión MA de los datos sin normalizar de los genes agrupados por sector en el microarreglo para los 3 experimentos. En el eje Y se encuentra el valor M ($\log_2(\text{control/experimental})$) que corresponde al grado de diferencia en la expresión entre las dos condiciones; en el eje de las X se encuentra el valor $A = (\log_2 \text{ control} + \log_2 \text{ experimental})/2$, que corresponde al promedio de la intensidad de la señal de expresión de ambas condiciones.

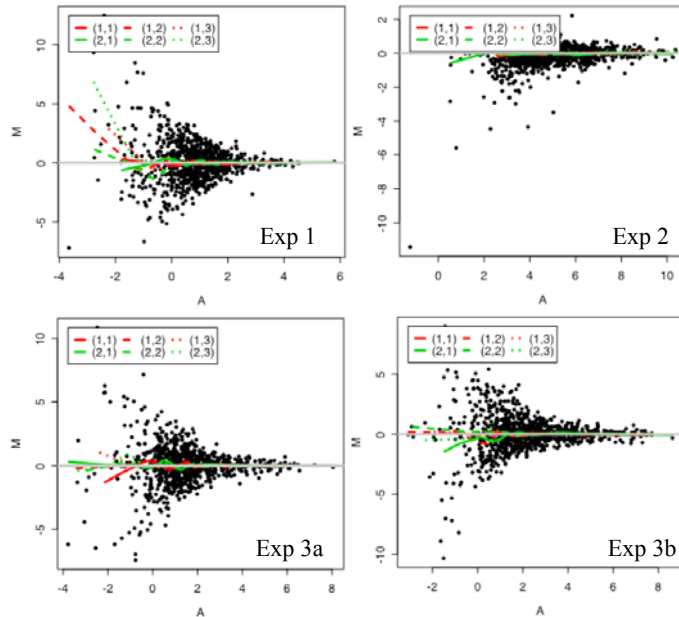


Fig. 14. Gráfica de dispersión MA de los datos normalizados de los genes agrupados por sector en el microarreglo para los 3 experimentos. En el eje Y se encuentra el valor M ($\log_2(\text{control/experimental})$) que corresponde al grado de diferencia en la expresión entre las dos condiciones; en el eje de las X se encuentra el valor $A = (\log_2 \text{ control} + \log_2 \text{ experimental})/2$, que corresponde al promedio de la intensidad de la señal de expresión de ambas condiciones.

En el análisis de la expresión diferencial, se encontró que 3 h horas después de someterse a la tarea de aprendizaje los animales presentan cambios consistentes a lo largo de los 3 experimentos de más de 1.5 veces en los niveles de RNAm en 13 de los 1176 genes analizados al compararse con la condición control .

De estos genes 4 presentan un incremento en la expresión, mientras que 9 tienen una disminución (Tabla 2).

Gen	Num de acceso	Cambio en la expresión
Modulador del elemento de respuesta a cAMP (CREM).	U04835	▲1.5 ± 0.2
Hairless.	U71293	▲1.9 ± 0.3
Proteína tipo fosducina (PhLP).	AF080433	▲2.8 ± 0.4
Dinamina 1.	X54531	▲2.6 ± 0.7
Pax 8.	X94246	▼5.1 ± 2.5
Proteína de dedos de zinc 386 tipo Kruppel (Znf386).	U67082	▼2.3 ± 0.6
Factor de transcripción relacionado a Runt-1 (Runx1).	L35271	▼1.7 ± 0.2
Acido graso-Coenzima A ligasa, cadena larga 5 (FACL5).	AB012933	▼2.2 ± 0.3
Enzima biosintética 3 de coenzima Q (Coq3).	L20427	▼2.7 ± 0.6
Metionina adenosiltransferasa I, alpha (Mat1a)	X15734	▼2.7 ± 1.0
Proteína salival tipo prohormonal SMR1-alpha2.	X77815	▼1.8 ± 0.3
Homólogo 9 de MAD en <i>Drosophila</i> (Madh9)	AF012347	▼1.6 ± 0.2
Metaloproteínasa de matriz 12 (Mmp12)	X98517	▼4.1 ± 2.5

Tabla 2. Genes expresados diferencialmente entre los grupos control y experimental, en los tres experimentos. Los cambios en la expresión se muestran como veces de cambio con respecto al control ± el error estándar de la media.

8. DISCUSION

En el presente trabajo se propuso el objetivo de identificar genes asociados a la consolidación de la memoria en el neocórtex. Para ello hicimos uso de la técnica de microarreglos, la cual permite determinar los genes que modifican su expresión en una condición versus otra condición.

Para la identificación de los genes que participan en los procesos de aprendizaje y memoria, se han empleado diversas tareas de aprendizaje. Sin embargo la mayoría de esas tareas requieren de varios ensayos, esto las hace inadecuadas para el estudio de los genes que participan en la consolidación de la memoria, ya que es imposible delimitar temporalmente el inicio de la misma. Esto deriva en la necesidad de utilizar tareas de aprendizaje de un solo ensayo que permitan una mejor resolución temporal. En el presente trabajo se tomaron otras consideraciones importantes en la selección de una tarea de aprendizaje para el análisis de la expresión génica. Entre éstas se incluye el reducir al mínimo otras fuentes de alteraciones en la expresión de los genes como el estrés, además de establecer un grupo control que no aprendiera la tarea de aprendizaje, pero que estuviera expuesto a los mismos estímulos sensoriales y a una actividad motora similar. La finalidad fue evitar que la expresión diferencial fuera causada por factores diferentes a la consolidación de la memoria.

A lo largo de los ensayos hechos para encontrar una tarea adecuada para el estudio central de este proyecto, encontramos que, a pesar de todos los intentos realizados durante dos semestres, no fue posible implementar una tarea sencilla de aprendizaje, que fuese mediada por reforzadores positivos, los cuales se supone son menos estresantes. En cambio, la tarea de evitación inhibitoria, utilizada en nuestro laboratorio durante muchos años, demostró, una vez más, ser capaz de inducir un aprendizaje rápido (en un solo ensayo), confiable (excelente retención) y que permite la medición de la memoria de largo plazo. Además, al combinar el uso de la cámara de evitación inhibitoria con una cámara de choque, permite el estudio simultáneo de un grupo control.

Aunque es difícil diseñar un grupo control perfecto, es probable que el grupo control empleado que recibe un choque en una cámara diferente a la del entrenamiento de

evitación inhibitoria, y que después se somete a este entrenamiento pero sin choque sea un grupo control apropiado. Los dos grupos de animales son sometidos a estímulos sensoriales muy similares y presumiblemente presenten niveles similares de miedo y ansiedad, activación motora, estrés y novedad. La diferencia más significativa entre los grupos es, la presencia o ausencia del aprendizaje de la tarea de evitación inhibitoria que es dependiente del neocórtex (Prado-Alcalá, 1995)

En cuanto a los genes asociados a la consolidación de la memoria identificados (cuya expresión se ve modificada después de la experiencia de aprendizaje en comparación con la condición control), no habían sido reportados previamente en otros estudios similares (Luo et al., 2001; Cavallaro et al., 2001; Cavallaro et al., 2002; Donahue et al., 2002; Leil et al., 2002; Robles et al., 2003).

Existen varias causas probables por las cuales los genes que habían sido previamente implicados en procesos de aprendizaje y memoria no fueron detectados en el presente estudio y por las cuales los genes identificados por este último no se habían reportado previamente.

La primera es que los estudios anteriores estudiaron los cambios de la expresión de genes ocurridos en el hipocampo (Luo et al., 2001; Cavallaro et al., 2001; Cavallaro et al., 2002; Donahue et al., 2002; Leil et al., 2002; Robles et al., 2003) y el cerebelo (Cavallaro et al., 2002b) y podrían existir algunas diferencias en los perfiles de genes entre las diferentes estructuras involucradas en la consolidación de la memoria. Esta noción es congruente con las diferencias previamente encontradas entre el hipocampo y el cerebelo en los genes que se modifican después del entrenamiento en una tarea de condicionamiento palpebral (Cavallaro et al., 2002b). Sin embargo, las estructuras estudiadas no explican del todo las diferencias de resultados entre los estudios, ya que se conoce que al menos una parte de los mecanismos moleculares de la memoria se encuentran conservados desde el punto de vista filogenético (Bailey et al., 1996), por lo tanto se puede suponer que algunos de los genes involucrados en la consolidación de la memoria son comunes. Por otro lado, no hay concordancia entre investigaciones similares previas (arriba citados) en la mayor parte de los genes reportados como asociados al aprendizaje y la memoria para una misma estructura.

Otra causa posible para la falta de concordancia entre estudios son los genes incluidos en los microarreglos empleados; muchos de los genes relevantes para la consolidación de la memoria no se encuentran presentes en el Atlas Rat Array 1.2 II de Clontech, el cual es un microarreglo de amplia cobertura de cDNA con una representación de genes relativamente pequeña. Nuestros datos sólo reflejan la expresión de esos 1176 genes.

Una tercera posibilidad son los criterios empleados para establecer el umbral de detección con el que se omiten genes cuya expresión no los cumple, y aún la expresión de genes debajo de dicho umbral podría ser crítico para la consolidación de la memoria. Sin embargo el uso de criterios menos estrictos conduce a un incremento en la proporción de falsos positivos.

Por otra parte, el condicionamiento en la tarea de evitación inhibitoria no necesariamente activa todas las células del neocórtex en el mismo grado. Dada la variedad de poblaciones neuronales en el neocórtex, la extracción de RNA del neocórtex total podría diluir cambios en la expresión de genes que ocurren en un subgrupo de células. Además, las diferencias individuales de los animales también podrían dar variabilidad a la muestra, aunque presuponemos que esa variabilidad podría reducirse trabajando con muestras obtenidas de grupos de ratas.

También es factible que las diferencias descritas entre el presente experimento y los experimentos referidos en esta discusión, pudieran deberse a las diferencias en las tareas de aprendizaje utilizadas, es decir que existan diferencias entre los genes que modifican su expresión entre las diferentes tareas de aprendizaje.

Adicionalmente, existen diferencias en los genes expresados a diferentes tiempos después del entrenamiento en la tarea de aprendizaje (Cavallaro et al., 2002; Cammarota, comunicación personal). Esto implica que el tiempo después del entrenamiento en el que se obtiene el material para el análisis de la expresión de genes, así como el tipo de tarea de condicionamiento empleada (tareas de múltiples ensayos podrían estar activando cambios en la expresión desde antes que la tarea de aprendizaje concluya) podrían tener un impacto importante en los genes identificados.

Finalmente, parece haber diferencias temporales en la participación de ciertas proteínas entre las estructuras cerebrales involucradas en el aprendizaje y la memoria, como

se ha evidenciado en el efecto sobre la MLP de inhibidores de las MAPK aplicados a diferentes tiempos en diferentes estructuras (Waltz et al., 2000a).

La mayor parte de los genes que cambiaron sus niveles de expresión se encontraron regulados a la baja. Debido a que la memoria de largo plazo puede ser bloqueada por inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas, la mayor parte de los reportes previos se han enfocado en la identificación de proteínas cuya expresión está regulada a la alta (Davis y Squire, 1984; Stork y Welzl, 1999). La reducción de la expresión de genes después del entrenamiento en una tarea de aprendizaje ya se ha reportado previamente en el hipocampo (Cavallaro et al., 2001; Donahue et al., 2002) y proporciona una nueva perspectiva de los mecanismos moleculares en las que subyace el almacenamiento de la memoria. Actualmente no se conoce cómo el silenciamiento de un número de genes juega un rol en el almacenaje de la memoria. Esta regulación a la baja podría deberse a que en la consolidación de la memoria se requiere una disminución en la expresión de proteínas que ejercen una restricción inhibitoria.

De los genes encontrados algunos son prospectos interesantes para un papel en la consolidación de la memoria. Entre ellos se encuentran genes que codifican para reguladores de la transcripción o participan en los sistemas de señalización intracelular como los que se describen a continuación.

Los productos del gen CREM pertenecen a la familia de factores de transcripción responsivos a cAMP. En esta familia se encuentra también CREB cuya participación en el almacenamiento de la memoria de largo plazo y en la LTP ha sido ampliamente documentada (Squire y Kandel, 2000). Existen varias isoformas de CREM generados por mecanismos de corte y empalmes (splicing) alternativos, el uso de codones de inicio alternativos, y un promotor intrónico alternativo (Sassone-Corsi, 1995). Algunas de las isoformas son activadoras y otras represoras de la transcripción. Las proteínas CREM al igual que las CREB pueden unirse a los sitios CRE en el DNA y regular la transcripción de genes controlados por estos sitios (De Cesare et al., 1999). Se ha reportado la expresión de CREM en estriado incrementa después de la estimulación con agonistas dopaminérgicos (Berke et al., 2003).

La proteína codificada por el gen “hairless” se ha reportado que funciona como un correpresor, aumentando la represión transcripcional ejercida por el receptor a hormonas

tiroideas que depende de desacetilasas de histonas en el cerebro de rata neonatal (Potter et al., 2002) y cuya expresión es inducida por la presencia de dichas hormonas (Thompson, 1996). Hairless se expresa en altos niveles en el cerebro de ratones, pero los ratones mutantes para este gen, jóvenes y adultos, no muestran enfermedades neurológicas aparentes ni anomalías gruesas en la corteza cerebelar, por lo que se ha sugerido que no es esencial para el desarrollo.

La Dinamina es una trifosfatasa de guanidina asociada a los microtúbulos importante para el reciclamiento de vesículas sinápticas en las neuronas, y por lo tanto para la neurotransmisión (van der Blik y Meyerowitz, 1991; Chen et al., 1991). Es requerido en procesos de memoria en *Drosophila* (Waddell y Quinn, 2001), y se ha reportado que la Dinamina I incrementa su expresión 3.2 veces en comparación con el control, en rebanadas estriatales en las que se indujo LTD (Napolitano et al., 1999)

La familia de genes Pax codifica para factores de transcripción que son esenciales en la organogénesis y en la diferenciación de varios órganos en eucariotes superiores. Pax8 es un factor de transcripción requerido para la morfogénesis de la glándula tiroidea y para el mantenimiento del fenotipo celular tiroideo diferenciado (Nitsch et al., 2004). Se ha sugerido que Pax8 junto con otros genes Pax juegan un rol importante durante el desarrollo en la especificación y/o mantenimiento de la región entre el cerebro medio y posterior en vertebrados mediante la regulación de la expresión de otros genes (Krelova et al., 2002).

La proteína codificada por el gen Znf386 también conocido como Kzfl pertenece a una familia de factores de transcripción que contienen la caja asociada Kruppel (dominio KRAB). Fue descubierta en las células germinales de los testículos (Bellefroid et al., 1998) y a la fecha no existen más datos al respecto. Las proteínas de esta familia pueden funcionar como represor transcripcional de los promotores para las RNA polimerasas I, II o III, así como del corte y empalme (splicing) del RNA. Miembros de esta familia están involucrados en el mantenimiento del nucleolo, la diferenciación y proliferación celular, apoptosis y transformación neoplásica (Urrutia, 2003).

El gen codificado por Runx1 es un factor de transcripción que parece estar relacionado en la diferenciación hematopoyética y se le ha relacionado con la génesis de leucemia (Otto et al., 2003). Parece tener un papel en el desarrollo de subtipos neuronales

en los mamíferos (Therriault et al., 2004); y en músculo su expresión parece ser regulada por la actividad eléctrica de la innervación (Zhu et al., 1994).

La fosducina es una proteína en la retina que regula la desensibilización de rodopsina mediante el control de la actividad de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK's), y se encuentran en niveles muy bajos en el sistema nervioso central de los mamíferos, sin embargo este tejido tiene proteínas relacionadas en secuencia y función. Las PhLP (proteínas tipo fosducina) participan en la desensibilización y desacoplamiento de receptores a opioides en la materia gris periaqueductal (Jordan e Iyengar, 1998; Garzon et al., 2002). En la consolidación de la memoria las PhLP podrían estar jugando un papel en la modificación de la eficiencia de sinapsis con receptores a neurotransmisores acoplados a proteínas G.

El gen *Madh9*, también conocido como *Smad8*, pertenece a la familia de transductores de señales Smads. *Smad8* es activado (fosforilación) por receptores cinasas serina/treonina tipo I (tenDijke y Hill, 2004; Moustakas et al., 2001)

Por otra parte otro grupo de genes que podrían tener un papel importante en la consolidación de la memoria son las metaloproteinasas de la matriz (como la metaloproteinasa de matriz 12) y sus inhibidores endógenos los cuales controlan de forma temporalmente restringida la proteólisis focal de la matriz extracelular. En las neuronas del cerebro adulto varios de los genes que codifican metaloproteinasas y sus inhibidores se expresan en respuesta a cambios en la actividad neural (Dzwonek et al., 2004). Existen datos que las metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores podrían participar en el remodelamiento de las conexiones sinápticas (Kaczmarek et al., 2002; Reeves et al., 2003).

Los cambios en la expresión de ciertos genes podrían ser posiblemente derivados de los cambios metabólicos inducidos en las células del neocórtex, tal como los detectados en el *fac15* y la *coq3*.

La forma en la que podrían participar los otros dos genes identificados en la consolidación de la memoria no es obvia. La metionina adenosiltransferasa I, α , participa en forma importante en el hígado para convertir la metionina de la dieta en S-adenosilmetionina (Avila et al., 2002). La S-adenosilmetionina no es sólo un metabolito intermedio del catabolismo de la metionina, sino también un "switch" de control

intracelular que controla funciones hepáticas esenciales como la regeneración, la diferenciación y la sensibilidad del órgano a las lesiones (Mato et al., 2002). Sin embargo, la expresión de este gen únicamente se ha reportado en el hígado (Hazelwood et al., 1998). La proteína salival tipo prohormonal SMR1- α 2 se expresa en glándulas submandibulares de la rata (Courty et al., 1994) y en menor grado en la próstata de los machos (Rosinski-Chupin et al., 1994), se ha encontrado que su expresión disminuye drásticamente en el pene después de una neuralectomía de los nervios cavernosos (User et al., 2003). Los datos sugieren que las formas activas del péptido codificado por este gen podrían tener funciones hormonales (Rougeot et al., 2000).

El tipo de genes identificados como asociados a la consolidación de la memoria, así como las discrepancias entre estudios previos similares sugieren que los eventos moleculares que subyacen a la consolidación de la memoria constituyen una complicada red y que es necesaria la realización de estudios sistemáticos que tomen en consideración diferentes tareas de aprendizaje, diferentes estructuras cerebrales, así como las diferencias temporales, además de estudios para validar la participación de estos genes en el almacenamiento a largo plazo de la memoria.

Otro aspecto que no ha sido considerado en este estudio y otros similares y que también debe ser tomada en cuenta en el futuro es la posibilidad de la participación de mecanismos de regulación post transcripcional en la consolidación de la memoria.

9. CONCLUSION

El entrenamiento de las ratas en una tarea de aprendizaje de evitación inhibitoria en un ensayo indujo cambios detectables en la expresión de genes en el neoestriado 3 horas después de concluida la tarea, comparado con la condición control.

Los genes identificados codifican para factores de transcripción, moléculas de señalización intracelular, una metaloproteinasa de la matriz, enzimas del metabolismo, y una proteína con posible función hormonal.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience*. 12:366-375.
- Alemán V, Camacho JL, Bermúdez-Rattoni F, Prado-Alcalá RA. 1982. Differential (35 S) methionine incorporation into protein of different brain areas of the rat during a learning task. *Behav. Neural Biol.* 36(2):137-45.
- Alonso M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH. 2002. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.* 22(5-6):663-74.
- Avila MA, García-Trevijano ER, Martínez-Chantar ML, Latasa MU, Perez-Mato I, Martínez-Cruz LA, del Pino MM, Corrales FJ, Mato JM. 2002. S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol.* 27(3):163-7.
- Bailey CH, Chen M. 1983. Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science*. 220(4592):91-3.
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13445-52.
- Bartsch D, Ghirardi M, Skehel PA, Karl KA, Herder SP, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. 1995. *Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell.* 83(6):979-92.
- Bartsch D, Casadio A, Karl KA, Serodio P, Kandel ER. 1998. CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell.* 95(2):211-23.
- Becker CG, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M. 1996. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res.* 45(2):143-52.
- Bellefroid EJ, Sahin M, Poncelet DA, Riviere M, Bourguignon C, Martial JA, Morris PL, Pieler T, Szpirer C, Ward DC. 1998. Kzfl - a novel KRAB zinc finger protein encoding gene expressed during rat spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1398(3):321-9.
- Berke JD, Paletzki RF, Aronson GJ, Hyman SE, Gerfen CR. 1998. A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci.* 18(14):5301-10.

- Bermúdez-Rattoni F, Mujica-Gonzalez M, Prado-Alcalá RA. 1986. Is cholinergic activity of the striatum involved in the acquisition of positively-motivated behaviors?. *Pharmacol Biochem Behav.* 24(3):715-9.
- Bermúdez-Rattoni F. 1998. Codificación de la memoria. *Revista de la Academia Mexicana de las Ciencias. CIENCIA.* 49:23-28.
- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. 1997. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(13):7041-6.
- Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2003. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci.* 17(4):897-902.
- Booker R, Quinn WG. 1981. Conditioning of leg position in normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3940-44.
- Cammarota M, Bernabeu R, Levi De Stein M, Izquierdo I, Medina JH. 1998. Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *Eur J Neurosci.* 10(8):2669-76.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH. 2000. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res.* 76(1):36-46.
- Carew TJ, Walters ET, Kandel ER. 1981. Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J Neurosci.* 1(12):1426-37.
- Carpenter MB. 1994. *Neuroanatomía fundamentos.* 4^a Edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 311-339.
- Cavallaro S, Schreurs BG, Zhao W, D'Agata V, Alkon DL. 2001. Gene expression profiles during long-term memory consolidation. *Eur. J. Neurosci.* 13:1809-15.
- Cavallaro S, D'Agata V, Manickam P, Dufour F, Alkon DL. 2002. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 9(25):16279-84.
- Choi KW, Smith RF, Buratowski RM, Quinn WG. 1991. Deficient protein kinase C activity in turnip, a *Drosophila* learning mutant. *J Biol Chem.* 266(24):15999-606.

- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
- Cobos-Zapiain GG, Salado-Castillo R, Sanchez-Alavez M, Quirarte GL, Roldán-Roldán G, Diaz del Guante MA, Prado-Alcala RA. 1996. High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiol Learn Mem.* 65(3):202-6.
- Connolly JB, Roberts IJ, Armstrong JD, Kaiser K, Forte M, Tully T, O'Kane CJ. 1996. Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* 274(5295):2104-7.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. 1986. *The biochemical basis neuropharmacology.* Ed Oxford University Press, New York.
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER. 1990. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature.* 345(6277):718-21.
- Davis HP, Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull.* 96(3):518-59.
- Deniau JM, Feger J, Le Guyader C. 1976. Striatal evoked inhibition of identified nigro-thalamic neurons. *Brain Res.* 104(1):152-6.
- DeCesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P. 1999. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci.* 24(7):281-5.
- DeZazzo J, Sandstrom D, de Belle S, Velinzon K, Smith P, Grady L, DelVecchio M, Ramaswami M, Tully T. 2000. nalyot, a mutation of the *Drosophila* myb-related Adfl transcription factor, disrupts synapse formation and olfactory memory. *Neuron.* 27(1):145-58.
- Divac I, Oberg RGE. 1979. *The Neostriatum.* Pergamon, Oxford.
- Donahue CP, Jensen RV, Ochiishi T, Eisenstein I, Zhao M, Shors T, Kosik KS. 2002. Transcriptional profiling reveals regulated genes in the hippocampus during memory formation. *Hippocampus.* 12(6):821-33.
- Dunnett SB, Iversen SD. 1981. Learning impairments following selective kainic acid-induced lesions within the neostriatum of rats. *Behav Brain Res.* 2(2):189-209.
- Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L. 2004. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett.* 567(1):129-35.

- Ferrante RJ, Kowall NW, Richardson EP Jr, Bird ED, Martin JB. 1986. Topography of enkephalin, substance P and acetylcholinesterase staining in Huntington's disease striatum. *Neurosci Lett.* 71(3):283-8.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Martin JB, Bird ED, Richardson EP Jr. 1987. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 46(1):12-27.
- Fox GB, O'Connell AW, Murphy KJ, Regan CM. 1995. Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J Neurochem.* 65(6):2796-9.
- Fibiger HC, Phillips AG, Zis AP. 1974. Deficits in instrumental responding after 6-hydroxydopamine lesions of the nigro-neostriatal dopaminergic projection. *Pharmacol Biochem Behav.* 2(1):87-96.
- Folkers E. 1982. Visual learning and memory of *Drosophila melanogaster* wild-type C-S and the mutants *dunce1*, *amnesiac*, *turnip* and *rutabaga* is required for learning in *Drosophila*. *J Insect Physiol.* 28:535-39.
- Freeman FM, Rose SP, Scholey AB. 1995. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem.* 63(3):291-5.
- Garzon J, Rodriguez-Diaz M, Lopez-Fando A, Garcia-Espana A, Sanchez-Blazquez P. 2002. Glycosylated phosducin-like protein long regulates opioid receptor function in mouse brain. *Neuropharmacology.* 42(6):813-28.
- Gerfen CR. 1984. The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature.* 311:461-4.
- Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J. 1987. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J Neurosci.* 7(12):3915-34.
- Gerfren CR, Wilson CJ. 1996. The basal ganglia. En: *Handbook of chemical neuroanatomy* Vol. 12. (Editado por Bjorklund A, Hokfelt T), Netherlands, Elsevier Science.
- Giordano M, Prado-Alcala RA. 1986. Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol Biochem Behav.* 24(4):905-9.
- Glick SD, Greenstein S. 1973. Comparative learning and memory deficits following hippocampal and caudate lesions in mice. *J Comp Physiol Psychol.* 82(2):188-94.

- Goedert M, Mantyh PW, Hunt SP, Emson PC. 1983. Mosaic distribution of neurotensin-like immunoreactivity in the cat striatum. *Brain Res.* 274(1):176-9.
- Goedert M, Mantyh PW, Emson PC, Hunt SP. 1984. Inverse relationship between neurotensin receptors and neurotensin-like immunoreactivity in cat striatum. *Nature.* 307(5951):543-6.
- Goldman PS, Nauta WJ. 1977. An intricately patterned prefronto-caudate projection in the rhesus monkey. *J Comp Neurol.* 72(3):369-86.
- Graybiel AM, Ragsdale CW Jr, Moon Edley S. 1979. Compartments in the striatum of the cat observed by retrograde cell labeling. *Exp Brain Res.* 34(1):189-95.
- Graybiel AM, Ragsdale CW Jr, Yoneoka ES, Elde RP. 1981. An immunohistochemical study of enkephalins and other neuropeptides in the striatum of the cat with evidence that the opiate peptides are arranged to form mosaic patterns in register with the striosomal compartments visible by acetylcholinesterase staining. *Neuroscience.* 6(3):377-97.
- Graybiel AM. 1983. Biochemical anatomy of the striatum. En: *Chemical neuroanatomy.* (Editado por Emson PC), New York, Reaven Press, pp. 437-503.
- Graybiel AM, Ragsdale CW Jr. 1983. Biochemical anatomy of the striatum. En: *Chemical neuroanatomy.* (Editado por Emson PC), New York, Reaven Press, pp. 427-504.
- Graybiel AM, Chesselet MF. 1984. Compartmental distribution of striatal cell bodies expressing [Met]enkephalin-like immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81(24):7980-4.
- Graybiel AM, Liu FC, Dunnett SB. 1989. Intra-striatal grafts derived from fetal striatal primordia. I. Phenotypy and modular organization. *J Neurosci.* 9(9):3250-71.
- Griffith LC, Verselis LM, Aitken KM, Kyriacou CP, Danho W, Greenspan RJ. 1993. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* disrupts behavioral plasticity. *Neuron.* 10(3):501-9.
- Grotewiel MS, Beck CD, Wu KH, Zhu XR, Davis RL. 1998. Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature.* 391(6666):455-60.
- Guo A, Li L, Xia SZ, Feng CH, Wolf R, Heisenberg M. 1996. Conditioned visual flight orientation in *Drosophila*: dependence on age, practice, and diet. *Learn Mem.* 3(1):49-59.
- Guzowski JF, McGaugh JL. 1997. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(6):2693-8.

- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci.* 21(14):5089-98.
- Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V. 2002. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton. *J Biol Chem.* 277(46):44180-6.
- Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT, Bennett RR, Greenberg SA, Kohane IS, Beggs AH, Kunkel LM. 2002. Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(23):15000-5.
- Haycock JW, Deadwyler SA, Sideroff SI, McGaugh JL. 1973. Retrograde amnesia and cholinergic systems in the caudate-putamen complex and dorsal hippocampus of the rat. *Exp Neurol.* 41(1):201-13.
- Hazelwood S, Bernardini I, Shotelersuk V, Tangerman A, Guo J, Mudd H, Gahl WA. 1998. Normal brain myelination in a patient homozygous for a mutation that encodes a severely truncated methionine adenosyltransferase I/III. *Am J Med Genet.* 75(4):395-400.
- Herkenham M, Pert CB. 1981. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature.* 291(5814):415-8.
- Hernandez PJ, Sadeghian K, Kelley AE. 2002. Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci.* 5(12):1327-31.
- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A. 2001. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(26):15044-9.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci.* 22(15):6781-9.
- Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. 1992. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol.* 58(1):16-26.
- Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. 1994. Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav Neural Biol.* 61(2):107-9.

- Jordan JD, Iyengar R. 1998. Modes of interactions between signaling pathways. *Biochem Pharmacol.* 55(9):1347-52.
- Joyce JN, Sapp DW, Marshall JF. 1986. Human striatal dopamine receptors are organized in compartments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(20):8002-6.
- Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J, Szymczak S. 2002. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections?. *EMBO J.* 21(24):6643-8.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of neural science. 4th Edition. McGraw Hill, USA. pp. 1227-1274.
- Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294(5544):1030-8.
- Kemp JM, Powell TP. 1971. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 262(845):383-401.
- Kim HJ, Routtenberg A. 1976. Retention disruption following post-trial picrotoxin injection into the substantia nigra. *Brain Res.* 113(3):620-5.
- Kirkby RJ, Kimble DP. 1968. Avoidance and escape behavior following striatal lesions in the rat. *Exp Neurol.* 20(2):215-27.
- Kitai ST, Kocsis JD, Preston RJ, Sugimori M. 1976. Monosynaptic inputs to caudate neurons identified by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 109(3):601-6.
- Kitai ST. 1981. Anatomy and physiology of the neostriatum. En: GABA and basal ganglia. Ed. Di Chiara G, Gessa GL. New York, Reaven Press.
- Krelova J, Holland LZ, Schubert M, Burgdorf C, Benes V, Kozmik Z. 2002. Functional equivalency of amphioxus and vertebrate Pax258 transcription factors suggests that the activation of mid-hindbrain specific genes in vertebrates occurs via the recruitment of Pax regulatory elements. *Gene.* 282(1-2):143-50.
- Lanca AJ, Boyd S, Kolb BE, van der Kooy D. 1986. The development of a patchy organization of the rat striatum. *Brain Res.* 392(1-2):1-10.
- Leil TA, Ossadtchi A, Cortes JS, Leahy RM, Smith DJ. 2002. Finding new candidate genes for learning and memory. *J Neurosci Res.* 68(2):127-37.
- Luo Y, Long JM, Spangler EL, Longo DL, Ingram DK, Weng NP. 2001. Identification of maze learning-associated genes in rat hippocampus by cDNA microarray. *J Mol Neurosci.* 17(3):397-404.

- Loopuijt LD, Sebens JB, Korf J. 1987. A mosaic-like distribution of dopamine receptors in rat neostriatum and its relationship to striosomes. *Brain Res.* 405(2):405-8.
- Malleret G, Haditsch U, Genoux D, Jones MW, Bliss TV, Vanhoose AM, Weitlauf C, Kandel ER, Winder DG, Mansuy IM. 2001. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell.* 104(5):675-86.
- Mato JM, Corrales FJ, Lu SC, Avila MA. 2002. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J.* 16(1):15-26.
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER. 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science.* 274(5293):1678-83.
- McGeer EG, Staines WA, McGeer PL. 1984. Neurotransmitters in the basal ganglia. *Can J Neurol Sci.* 11(1 Suppl):89-99.
- Menne D, Spatz HC. 1977. Colour vision in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol.* 114:301-12.
- Mitcham JC, Thomas RK Jr. 1972. Effects of substantia nigra and caudate nucleus lesions on avoidance learning in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 81(1):101-7.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.* 114(Pt 24):4359-69.
- Moyer KE. Neuroanatomía. México. Interamericana.
- Napolitano M, Marfia GA, Vacca A, Centonze D, Bellavia D, Di Marcotullio L, Frati L, Bernardi G, Gulino A, Calabresi P. 1999. Modulation of gene expression following long-term synaptic depression in the striatum. *Brain Res Mol Brain Res.* 72(1):89-96.
- Neill DB, Grossman SP. 1970. Behavioral effects of lesions or cholinergic blockade of the dorsal and ventral caudate of rats. *J Comp Physiol Psychol.* 71(2):311-7.
- Nitsch R, Di Palma T, Mascia A, Zannini M. 2004. WBP-2, a WW domain binding protein, interacts with the thyroid-specific transcription factor Pax8. *Biochem J.* 377(Pt 3):553-60.
- O'Connell AW, Fox GB, Barry T, Murphy KJ, Fichera G, Foley AG, Kelly J, Regan CM. 1997. Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem.* 68(6):2538-46.

- Olson L, Seiger A, Fuxe K. 1972. Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: highly fluorescent islands in developing and adult rats. *Brain Res.* 44(1):283-8.
- Ortega A, del Guante MA, Prado-Alcala RA, Aleman V. 1996. Changes in rat brain muscarinic receptors after inhibitory avoidance learning. *Life Sci.* 58(9):799-809.
- Otto F, Lubbert M, Stock M. 2003. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem.* 89(1):9-18.
- Petricoin EF 3rd, Hackett JL, Lesko LJ, Puri RK, Gutman SI, Chumakov K, Woodcock J, Feigal DW Jr, Zoon KC, Sistare FD. 2002. Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nat Genet.* 32 Suppl:474-9.
- Pinto S, Quintana DG, Smith P, Mihalek RM, Hou ZH, Boynton S, Jones CJ, Hendricks M, Velinzon K, Wohlschlegel JA, Austin RJ, Lane WS, Tully T, Dutta A. 1999. *latheo* encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant. *Neuron.* 23(1):45-54.
- Potter GB, Zarach JM, Sisk JM, Thompson CC. 2002. The thyroid hormone-regulated corepressor hairless associates with histone deacetylases in neonatal rat brain. *Mol Endocrinol.* 16(11):2547-60.
- Prado-Alcalá RA, Grinberg-Zylberbaun J, Alvarez-Leefmans J, Gomez A, Singer S, Brust-Carmona H. 1972. A possible caudate-cholinergic mechanism in two instrumental conditioned responses. *Psychopharmacologia.* 25(4):339-46.
- Prado-Alcalá RA, Grinberg-Zylberbaum J, Alvarez-Leefmans J, Brust-Carmona H. 1973. Suppression of motor conditioning by the injection of 3 M KCl in the caudate nuclei of cats. *Physiol Behav.* 10(1):59-64.
- Prado-Alcalá RA, Grinberg ZJ, Arditti ZL, Garcia MM, Prieto HG, Brust-Carmona H. 1975. Learning deficits produced by chronic and reversible lesions of the corpus striatum in rats. *Physiol Behav.* 15(3):283-7.
- Prado-Alcala RA, Cobos-Zapiain GC. 1977. Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Res.* 138(1):190-6.
- Prado-Alcalá RA, Cobos-Zapiain GG. 1979. Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a 'moving' engram. *Brain Res.* 172(3):577-83.
- Prado-Alcalá RA, Kaufmann P, Moscona R. 1980. Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacol Biochem Behav.* 12(2):249-53.

- Prado-Alcalá RA, Signoret L, Figueroa M. 1981. Time-dependent retention deficits induced by post-training injections of atropine into the caudate nucleus. *Pharmacol Biochem Behav.* 15(4):633-6.
- Prado-Alcalá RA, Signoret-Edward L, Figueroa M, Giordano M, Barrientos MA. 1984. Post-trial injection of atropine into the caudate nucleus interferes with long-term but not with short-term retention of passive avoidance. *Behav Neural Biol.* 42(1):81-4.
- Prado-Alcalá RA. 1991. Fisiología del aprendizaje y la memoria. En: *Fisiología Humana. I. Neurofisiología.* Ninomiya G (Ed) El Manual Moderno. México. pp 442-508.
- Prado-Alcalá RA. 1995. Serial and parallel processing during memory consolidation. En: *Plasticity in the Central Nervous System. Learning and Memory.* Editado por J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, y R. A. Prado-Alcalá, Lawrence Erlbaum Publishers. pp. 57-65.
- Prado-Alcalá RA, Quirarte GL. 1993. La conducta y la mente. *Información Científica y Tecnológica.* Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Vol 15.
- Prado-Alcalá RA, Fernandez-Ruíz J, Quirarte GL. 1993. Cholinergic neurons and memory. En: Stone TW (comp.), *Synaptic Transmission 2.* Taylor and Francis (Londres), pp 57-59.
- Prado-Alcalá RA. 1998. ¿En dónde se encuentra la memoria? *CIENCIAS*, 49:26-28.
- Prado-Alcalá RA, Quirarte GL. 1998. De la memoria y el cerebro. En: *Biología de la mente.* De la Fuente R, Alvarez-Leefmans FJ (Ed) Colección de Psicología y Psiquiatría. Ed. Fondo de Cultura Económica, México. pp245-256.
- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. 1999. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem.* 6(6):600-7.
- Quinn WG, Harris WA, Benzer S. 1974. Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 71(3):708-12.
- Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. 2001. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods.* 25(4):443-51.
- Ramirez-Amaya V, Escobar ML, Chao V, Bermudez-Rattoni F. 1999. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus.* 9(6):631-6.
- Reeves TM, Prins ML, Zhu J, Povlishock JT, Phillips LL. 2003. Matrix metalloproteinase inhibition alters functional and structural correlates of deafferentation-induced sprouting in the dentate gyrus. *J Neurosci.* 23(32):10182-9.

- Ressler KJ, Paschall G, Zhou XL, Davis M. 2002. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *J Neurosci.* 22(18):7892-902.
- Rivas S, Prado-Alcala RA. 1985. Ineficacia del haloperidol para modificar la retención de una tarea de prevención pasiva. XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Puebla, Pue. México.
- Robles Y, Vivas-Mejia PE, Ortiz-Zuazaga HG, Felix J, Ramos X, Pena de Ortiz S. 2003. Hippocampal gene expression profiling in spatial discrimination learning. *Neurobiol Learn Mem.* 80(1):80-95.
- Rohrbough J, Pinto S, Mihalek RM, Tully T, Broadie K. 1999. *latheo*, a *Drosophila* gene involved in learning, regulates functional synaptic plasticity. *Neuron.* 23(1):55-70.
- Rohrbough J, Grotewiel MS, Davis RL, Broadie K. 2000. Integrin-mediated regulation of synaptic morphology, transmission, and plasticity. *J Neurosci.* 20(18):6868-78.
- Rose SP. 1991. How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. *Trends Neurosci.* 14(9):390.
- Rosenzweig MR. 1996. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu Rev Psychol.* 47:1-32.
- Rosinski-Chupin I, Rougeot C, Courty Y, Rougeon F. 1993. Localization of mRNAs of two androgen-dependent proteins, SMR1 and SMR2, by in situ hybridization reveals sexual differences in acinar cells of rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem.* 41(11):1645-9.
- Rougeot C, Rosinski-Chupin I, Mathison R, Rougeon F. 2000. Rodent submandibular gland peptide hormones and other biologically active peptides. *Peptides.* 21(3):443-55.
- Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. 2000. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(13):7657-62.
- Salado-Castillo R, Prado-Alcala RA. 1987. Effects of the picrotoxin injections into different regions of the striatum on retention of passive avoidance. 17th Annual Meeting, Society for Neuroscience, New Orleans, LA, EUA., Society for Neuroscience Abstracts. 13.
- Sanberg PR, Pisa M, Fibiger HC. 1979. Avoidance, operant and locomotor behavior in rats with neostriatal injections of kainic acid. *Pharmacol Biochem Behav.* 10(1):137-44.
- Sandberg K, Sanberg PR, Hanin I, Fisher A, Coyle JT. 1984. Cholinergic lesion of the

- striatum impairs acquisition and retention of a passive avoidance response. *Behav Neurosci.* 98(1):162-5.
- Sassone-Corsi P. 1995. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:355-77.
- Siegel CJ. 1981. *Basic Neurochemistry.* Little, Brown and Company Coston.
- Simon R, Radmacher MD, Dobbin K. 2002. Design of studies using DNA microarrays. *Genet Epidemiol.* 23(1):21-36.
- Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. 1992. Impaired spatial learning in alpha-calmodulin-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 257(5067):206-11.
- Spencer HJ. 1976. Antagonism of cortical excitation of striatal neurons by glutamic acid diethyl ester: evidence for glutamic acid as an excitatory transmitter in the rat striatum. *Brain Res.* 102(1):91-101.
- Squire LR. 1987. *Memory and Brain.* University Press, Oxford.
- Squire LR, Kandel ER. 2000. Memory from mind to molecules. *Scientific American Library.*
- Staubli U, Huston JP. 1978. Effects of post-trial reinforcing vs. subreinforcing stimulation of the substantia nigra on passive avoidance learning. *Brain Res Bull.* 3(5):519-24.
- Stork O, Welzl H. 1999. Memory formation and the regulation of gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 55(4):575-92.
- Sweatt JD. 2001. Protooncogenes subserve memory formation in the adult CNS. *Neuron.* 31(5):671-4.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci.* 4(8):813-8.
- Tan SE, Liang KC. 1996. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain Res.* 711(1-2):234-40.
- Tempel BL, Bonini N, Dawson DR, Quinn WG. 1983. Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80(5):1482-6.
- Theriault FM, Roy P, Stifani S. 2004. AML1/Runx1 is important for the development of hindbrain cholinergic branchiovisceral motor neurons and selected cranial sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101(28):10343-8.
- Thompson CC. 1996. Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include

- a novel synaptotagmin and a hairless homolog. *J Neurosci.* 16(24):7832-40.
- Tully T, Quinn WG. 1985. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]*. 157(2):263-77.
- Urrutia R. 2003. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol.* 4(10):231.
- User HM, Zelner DJ, McKenna KE, McVary KT. 2003. Microarray analysis and description of SMR1 gene in rat penis in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction. *J Urol.* 170(1):298-301.
- Van der Blik AM, Meyerowitz EM. 1991. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature.* 351(6325):411-4.
- Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi P, Pereira P, Rodrigues C, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I. 2000a. Differential role of hippocampal cAMP-dependent protein kinase in short- and long-term memory. *Neurochem Res.* 25(5):621-6.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. 2000b. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 7(5):333-40.
- Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH, Izquierdo I. 2001. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Braz J Med Biol Res.* 34(2):233-40.
- Viola H, Furman M, Izquierdo LA, Alonso M, Barros DM, de Souza MM, Izquierdo I, Medina JH. 2000. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *J Neurosci.* 20(23):RC112.
- Waddell S, Quinn WG. 2001. What can we teach *Drosophila*? What can they teach us?. *Trends Genet.* 17(12):719-26.
- Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna MK, Madruga M, Rodrigues C, Gottfried C, Medina JH, Izquierdo I. 2000a. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem.* 73(1):11-20.
- Walz R, Lenz G, Roesler R, Vianna MM, Martins V, Brentani R, Rodnight R, Izquierdo I. 2000b. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur J Neurosci.* 12(6):2185-9.

- Wilson CJ, Groves PM. 1980. Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 194(3):599-615.
- Winocur G. 1974. Functional dissociation within the caudate nucleus of rats. *J Comp Physiol Psychol.* 86(3):432-9.
- Wolfman C, Fin C, Dias M, Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I. 1994. Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav Neural Biol.* 61(3):203-5.
- Wustmann G, Rein K, Wolf R, Heisenberg M. 1996. A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A].* 179(3):429-36.
- Wustmann G, Heisenberg M. 1997. Behavioral manipulation of retrieval in a spatial memory task for *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem.* 4(4):328-36.
- Wyers EJ, Deadwyler SA, Hirasuna N, Montgomery D. 1973. Passive avoidance retention and caudate stimulation. *Physiol Behav.* 11(6):809-19.
- Yarm FR. 2002. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol.* 22(17):6209-21.
- Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T. 1994. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell.* 79(1):49-58.
- Yin JC, Del Vecchio M, Zhou H, Tully T. 1995. CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell.* 81(1):107-15.
- Yoshida M, Precht W. 1971. Monosynaptic inhibition of neurons of the substantia nigra by caudato-nigral fibers. *Brain Res.* 32(1):225-8.
- Zhao W, Lawen A, Ng KT. 1999. Changes in phosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in processing of short-term and long-term memories after passive avoidance learning. *J Neurosci Res.* 55(5):557-68.
- Zhu X, Yeadon JE, Burden SJ. 1994. AML1 is expressed in skeletal muscle and is regulated by innervation. *Mol Cell Biol.* 14(12):8051-7.

11. APÉNDICE A. ESTABLECIMIENTO DE LA TAREA DE APRENDIZAJE DE UN ENSAYO.

Inherente al proceso de aprendizaje es la producción de un estado de estrés, independientemente del tipo de aprendizaje que se esté adquiriendo. El grado de estrés depende de qué tan aversiva es la situación de aprendizaje. Aún en situaciones en las que el individuo recibe reforzadores positivos como consecuencia de su conducta (e.g., recibir comida o agua por haber presionado una palanca), al enfrentarse por vez primera al ambiente experimental se pueden registrar respuestas fisiológicas que denotan que el sujeto está estresado (e.g., inmovilidad, cambios en la frecuencia cardiaca y en la presión arterial). Sin embargo, al familiarizarse con la situación, estas respuestas desaparecen. Tratándose de aprendizajes de tipo aversivo, en los que los animales reciben estímulos nocivos, tales como choques eléctricos, las reacciones de estrés pueden ser muy obvias (defecación, micción, vocalizaciones, respuestas de alejamiento de la fuente de estimulación, etc.).

En virtud de que el objetivo de esta tesis fue determinar la posible inducción de genes en el estriado como consecuencia de un proceso de aprendizaje, era de vital importancia definir una situación de aprendizaje en la que se pudieran descartar posibles cambios en la producción de genes asociados simplemente al estrés.

Para cumplir con este objetivo, la parte de esta tesis se inició, precisamente, con la búsqueda de una tarea de aprendizaje que permitiera disociar los efectos del aprendizaje, de aquellos que pudieran producirse por el estrés. Para lograr este objetivo, en esta fase experimental diseñamos y modificamos varios modelos conductuales, hasta que implementamos un diseño que nos permitió someter a la prueba experimental el objetivo propuesto.

A continuación describiremos los 14 modelos de aprendizaje implementados, que nos llevaron a elegir el que se utilizó para analizar los cambios en la expresión de genes, derivados de una experiencia de aprendizaje.

Sujetos. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 300 a 350 gramos, los cuales permanecieron en el laboratorio una semana antes en cajas individuales y en las condiciones del bioterio con un ciclo de luz-oscuridad (12-12), temperatura

controlada de 23° C, agua y alimento *ad libitum*. La asignación de los sujetos a cada uno de los grupos se realizó de forma aleatoria.

En cada experimento se realizó una sesión de manipulación de los animales (3 a 5 min diarios) durante 2 días previos a la sesión de habituación, con el fin de disminuir alguna posible respuesta de estrés, así como una sesión de *habituación al alimento*. En la sesión de habituación al alimento se le permitió a las ratas conocer y consumir un alimento endulzado (alimento que posee la propiedad de ser un reforzador positivo aún para ratas alimentadas *ad libitum*), con la finalidad de anular algún comportamiento neofóbico en éstas en la sesión posterior de adquisición.

Tareas apetitivas con ratas no privadas

Experimento 1

Aparatos.

Caja hogar, las cuales son de polipropileno transparente con 20 cm de alto, 25 cm de ancho y 47 cm de largo, y contienen aserrín en el piso.

Procedimiento

Consistió en 6 sesiones en cada una de las cuales se extrajo la rata de su caja hogar, se colocó en ella un recipiente de plástico circular de 7 cm de diámetro y 1.5 cm de altura con un alimento nuevo (leche endulzada, o el cereal de maíz, avena y trigo con saborizantes de frutas conocido comercialmente como “Froot-Loops”) en uno de los extremos de la caja.

Posteriormente se introdujo la rata en el extremo opuesto a la localización del recipiente y con la cabeza en dirección contraria al mismo. Se les permitió ingerir libremente durante 5 min después de lo cual el alimento nuevo fue retirado. Las sesiones se realizaron en un cuarto sonoamortiguado. Con la finalidad de determinar cual de los alimentos era más apetitivo se midieron 2 parámetros: la latencia para empezar a ingerir el alimento, y el tiempo que se mantenían ingiriendo. Se estudiaron 2 ratas por grupo (tipo de alimento).

RESULTADOS

Las ratas presentan una respuesta neofóbica ante la presencia de un alimento nuevo (no ingesta de alimento) los primeros días, la cual desaparece a partir del tercer día (ver Figs 1.1 y 1.2). También se muestra que no hay una gran diferencia en cuanto a las capacidades apetitivas de los dos tipos de alimentos empleados (ver Figs 1.1 y 1.2). Lo anterior indica que los animales requieren más de 5 min para perder su respuesta neofóbica, e ingerir el alimento, por ello se decidió para el subsecuente experimento que las ratas tuvieran acceso libre al alimento por un periodo prolongado (habituaación durante una noche). Teniendo en mente la posibilidad de emplear posteriormente un aparato para medir el tiempo contacto de la lengua con una boquilla de bebedero como medida del aprendizaje se eligió a la leche endulzada como el reforzador de la tarea apetitiva en un ensayo.

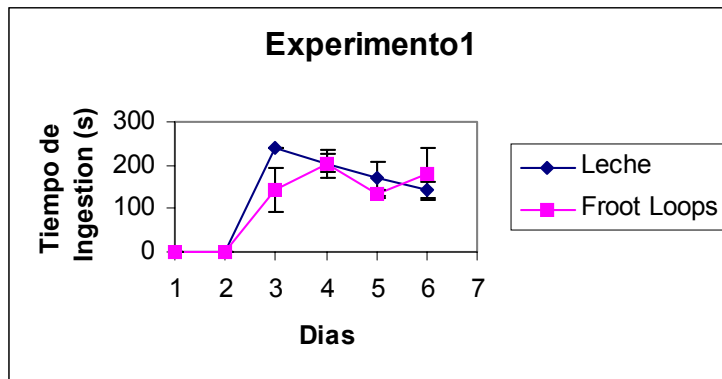


Fig. 1.1. Tiempo de ingestión del alimento nuevo en la caja hogar

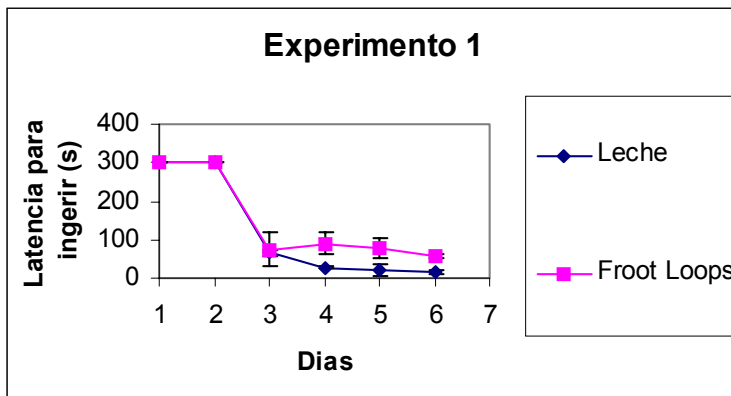


Fig. 1.2. Latencia para ingerir el alimento nuevo en la caja hogar

Experimento 2

Aparatos.

Cámara de condicionamiento 1. Es una cámara que consta de dos compartimentos, contruidos con acrílico rojo transparente que permite observar la conducta de los animales mientras realizan la tarea; cada uno mide 30cm x 30cm x 30cm y están separados por una puerta tipo guillotina. En el compartimento “A” el piso y las paredes lo forman dos láminas de acero que forman una “V” hacia el centro del piso, entre las cuales hay 1.5 cm de separación. El piso del compartimento “B” está formado por una rejilla de tubos de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separados por una distancia de 1.5 cm de centro a centro. En este compartimento hay un recipiente para alimento fijado al piso localizado en el extremo opuesto al sitio de la puerta. El recipiente fue de 5 cm de diámetro y 1.5 cm de altura pintado de color negro para impedir que pudiera verse su contenido a través de las paredes y fue colocado sobre una base a 5cm de altura, para evitar que la rata pudiera ver su interior desde el compartimento B. La cámara de condicionamiento está localizada en un cuarto sonoamortiguado (Fig. 1 del apartado 6.1).

Procedimiento

El experimento consistió en 3 sesiones de habituación a la cámara de condicionamiento realizadas cada 24 h, una sesión de adquisición y una de retención, cada una de 5 min de duración y después de las cuales las ratas fueron regresadas inmediatamente a su caja hogar. La habituación al alimento nuevo (leche endulzada) se realizó permitiendo a la rata libre acceso al alimento, en un recipiente de vidrio transparente de 6.5 cm de diámetro y 1 cm de altura, en su caja hogar dentro del bioterio durante toda la noche del día previo a la primera sesión de habituación a la cámara de condicionamiento. Cada sesión de habituación consistió en colocar a la rata en la cámara de condicionamiento 1 en el compartimento A con la cabeza en dirección opuesta a la puerta tipo guillotina y después de 10 s se abrió la misma y permitió explorar libremente; en el grupo experimental el recipiente se encontró vacío y destapado, y en el grupo control el recipiente se encontró vacío y cubierto con una tapa con agujeros. En la sesión de adquisición se siguió el mismo procedimiento que en la habituación, pero se colocó leche endulzada en el recipiente. En la

sesión de retención el procedimiento fue similar al de la habituación. La variable dependiente utilizada como medida de aprendizaje fue la latencia para husmear el recipiente. Se emplearon 4 ratas en cada grupo.

RESULTADOS

De acuerdo a pruebas de Kruskal-Wallis no hay diferencias en la adquisición entre el grupo control y el experimental ($p=0.773$); así como tampoco las hay en la retención ($p=0.083$). Dentro del grupo experimental no hay diferencia entre la sesión de adquisición y la de retención ($p=0.248$) Dentro del grupo control tampoco hay diferencias entre la adquisición y la retención ($p=0.348$). Ver la Figura 2.1.

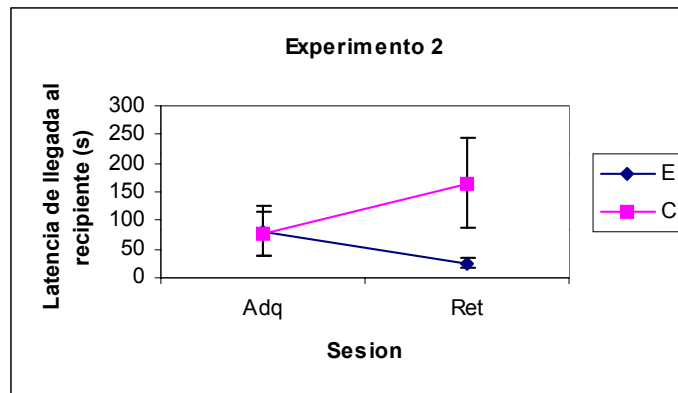


Fig. 2.1. Latencia para husmear el recipiente con alimento nuevo en la cámara de condicionamiento 1

Experimento 3

Contemplado la posibilidad de que la latencia para ingerir o husmear pudiera no ser un buen indicador de la memoria en una cámara de condicionamiento con espacio reducido, se ensayó usando la cámara de condicionamiento 2 con mayor espacio.

Aparatos.

Cámara de condicionamiento 2. Es una cámara circular de 154 cm de diámetro con paredes de 60cm de altura. El piso y las paredes son de plástico color negro. En el centro de la cámara se colocó el recipiente para alimento. El recipiente fue de 5 cm de diámetro y 1.5

cm de altura pintado de color negro y fue colocado sobre una base a 5cm de altura. La cámara de condicionamiento se localizó en un cuarto sonoamortiguado.

Procedimiento

El procedimiento fue similar al del experimento 2, difiriendo sólo en que se empleó la cámara de condicionamiento 2. Se estudiaron 5 ratas en cada grupo.

RESULTADOS

En la figura 3.1 se muestran latencias para ingerir el alimento cercanas al tiempo de corte (5 min), y de hecho las ratas no ingirieron la leche en el recipiente colocado en el centro de la cámara (no mostrado en la gráfica), dicho reforzamiento positivo es prerequisite para que pueda ocurrir el aprendizaje y dado que no ocurrió, no se continuó el experimento. El hecho de haya habido una nula exploración de los animales en el área del centro de la cámara de condicionamiento durante las sesiones de habituación (no mostrado en la gráfica), sugiere que la fobia natural de las ratas los campos abiertos pudiera haber impedido la ejecución de la tarea.

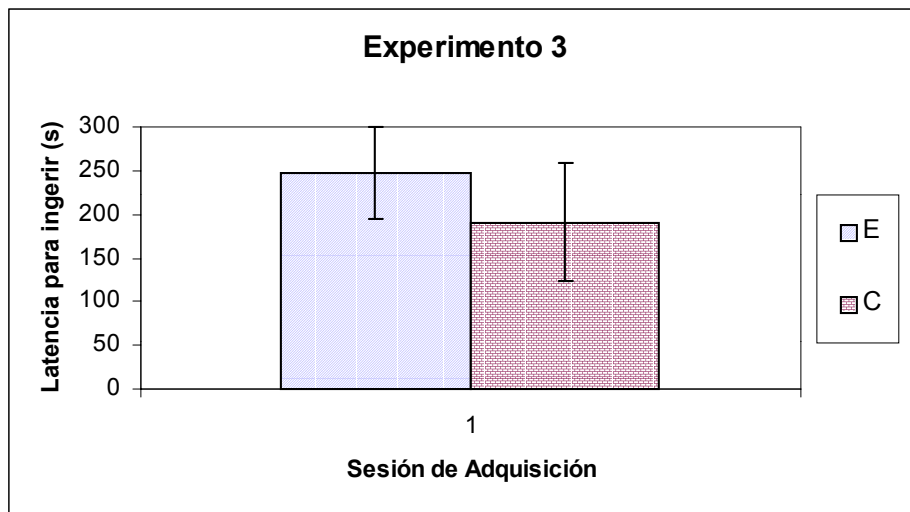


Fig. 3.1 Latencia para ingerir el alimento en la cámara de condicionamiento 2

Experimento 4

Aparatos.

Cámara de condicionamiento 1.

Procedimiento

Similar a la del experimento 2, pero con la diferencia de que todas las sesiones fueron de 10 min, se realizaron sólo 2 sesiones de habituación a la cámara de condicionamiento y se empleó como medida de aprendizaje la preferencia de lugar (tiempo en el compartimiento B). Cuando el cuerpo del animal no estuvo completamente dentro de un compartimiento, se consideró que se encontraba en el compartimiento en el que estuviera la cabeza. Se estudiaron 5 ratas en cada grupo.

RESULTADOS

No se observó diferencia entre las sesiones (ver Fig 4.1). Debido a que hay un sitio de preferencia de las ratas desde la primera sesión y ese sitio coincide con el sitio cuya preferencia es posiblemente reforzada con la presencia del alimento endulzado, es imposible discernir si ocurrió un aprendizaje. La preferencia observada pudiera atribuirse a la diferencia en espacio de los compartimientos de la cámara de condicionamiento, de tal forma que la probabilidad de estar en uno u otro es desigual.

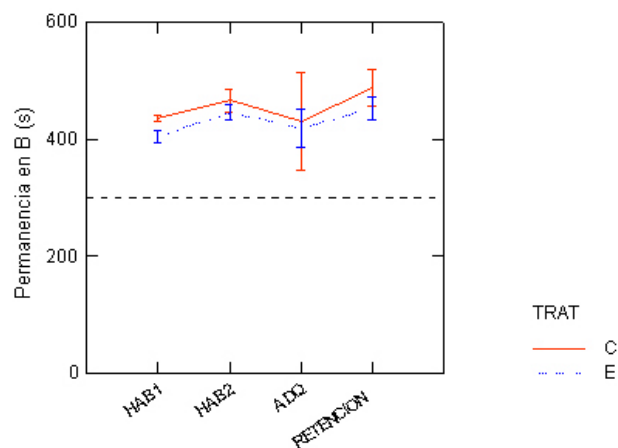


Fig. 4.1. Preferencia de lugar en la cámara de condicionamiento 1

Experimento 5

Aparatos.

Cámara de condicionamiento 3. La cámara que consta de dos compartimentos con paredes de acrílico transparente que permiten observar la conducta de los animales mientras realizan la tarea; cada compartimento mide 20cm x 20cm x 20cm y están separados entre sí por una barrera de lámina de 20cm de ancho y 4.5cm de altura colocada a nivel del piso. El piso de ambos compartimentos está formado por una rejilla con tubos de aluminio de 0.2 cm de diámetro, separados por una distancia de 1.0 cm de centro a centro. En el compartimento B hay un recipiente para alimento fijado al piso localizado en una de las esquinas alejadas del otro compartimento. El compartimento A es aquel en donde no hay recipiente. La cámara de condicionamiento se localizó en un cuarto sonoamortiguado.

Procedimiento

El procedimiento es similar al del experimento 4, siendo la única diferencia que en la cámara de condicionamiento 3 no hay puerta entre los dos compartimentos. Se estudiaron 8 ratas en cada grupo.

RESULTADOS

Se encontró un cambio en la preferencia de lugar en la sesión de retención, el cual ocurre tanto en el grupo experimental como en el control (ver Fig 5.1). Si dicho cambio fuera debido a un aprendizaje significaría que en el grupo control, el olor de leche endulzada (al que fueron expuestos) por sí mismo fue reforzante.

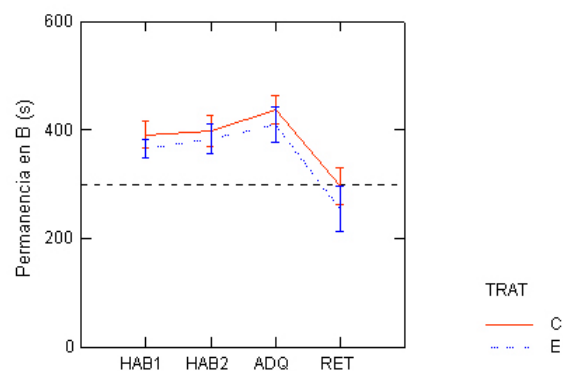


Fig 5.1. Preferencia de lugar en la cámara de condicionamiento 3

Experimento 6

Aparatos. Cámara de condicionamiento 3

Procedimiento

Se repitió el procedimiento empleado en el experimento 5, pero al grupo control no se le puso leche en el recipiente en la sesión de adquisición. Se estudiaron 10 ratas en cada grupo.

RESULTADOS

Los resultados de este experimento no muestran cambios en la preferencia de lugar a lo largo de las sesiones, las ratas tienden a estar en el 50% del tiempo en uno de los compartimentos (y otro 50% en el otro compartimento), tal como se esperaría en una cámara cuyos compartimentos son iguales y no existe algún factor que influya en la preferencia. A pesar de que la mayor parte de las ratas del grupo experimental ingirieron el alimento (observación no cuantificada), la figura 6.1 pareciera mostrar que no hay diferencias en la adquisición ni retención, lo que es indicio de que las ratas pueden ingerir leche en el recipiente localizado en el compartimento B sin que exista un cambio significativo en la preferencia de lugar, y por lo tanto de que no es buen indicador del aprendizaje y la retención de esta tarea en particular.

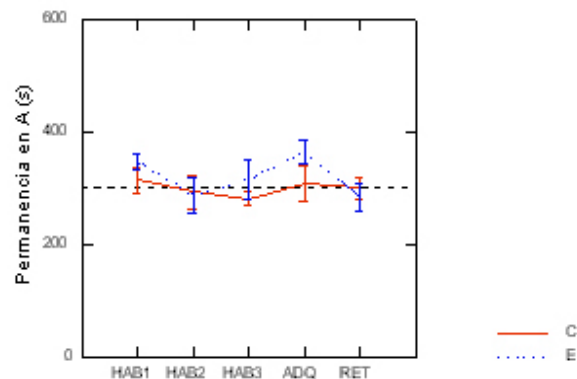


Fig 6.1. Preferencia de lugar en la cámara de condicionamiento3

Experimento 7

Aparatos.

Cámara de condicionamiento 3

Dipsómetro. Es un aparato electrónico que cuenta el tiempo que permanece cerrado un circuito eléctrico. Dicha información se envía a una computadora y se maneja en un software diseñado *ad hoc*. El circuito lo constituyen dos partes: la primera, una de las terminales del dipsómetro conectado por un cable a las varillas metálicas que forman el piso del compartimento B de la cámara de condicionamiento 3, las cuales se encuentran conectadas en corto. La segunda parte es el bebedero el cual puede contener leche endulzada, y que tiene una boquilla metálica, la cual se conecta a otra terminal y se encuentra aislada eléctricamente de la parte 1 del circuito. El circuito se cierra cuando la rata se encuentra sobre el piso del compartimento B y su boca o lengua hacen contacto con la boquilla del bebedero.

Procedimiento

El procedimiento es similar al del experimento 6, pero se utiliza el tiempo que se mantiene cerrado el circuito arriba mencionado como medida del aprendizaje. En la sesión de adquisición se dejó restos de leche en la parte externa de la boquilla del bebedero y en el piso inmediatamente debajo de él para facilitar que las ratas adquirieran la tarea. Por alguna razón no bien determinada algunas de las ratas ingirieron y otras no, por lo que se decidió que para las 20 ratas empleadas hubiera leche en el bebedero. Se emplearon como grupo experimental aquellas que ingirieron leche ($n=9$), y como grupo control aquellas que no lo hicieron ($n=11$)

RESULTADOS

Se encontró que un grupo de ratas (el experimental) tiene una marcada diferencia en el tiempo que permanecen en contacto con la boquilla del bebedero de leche endulzada, lo cual muestra que esta tarea sí es aprendida en la sesión de adquisición. Sin embargo este cambio no es observable en la sesión de retención (ver Fig 7.1). Estos resultados pudieran ser debidos simplemente a que la experiencia no fue consolidada en memoria de largo plazo, o que esta tarea en particular (en la cual las ratas no fueron privadas de alimento, y

en la que por lo tanto su motivación sería considerablemente menor que en una tarea para la cual fueran privadas) tuviera una extinción muy rápida que ocurriera en un tiempo muy breve en comparación con la duración de la sesión de retención.

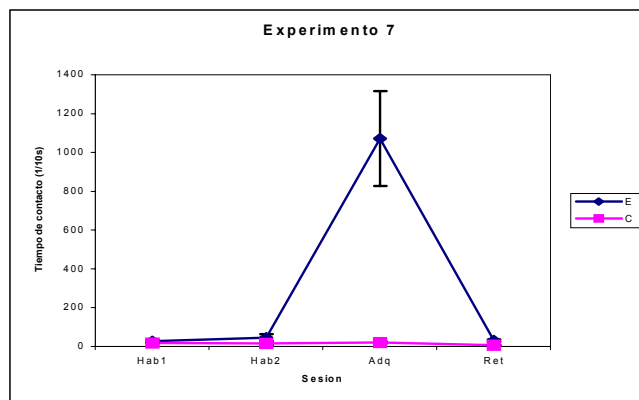


Fig 7.1. Tiempo de contacto con la boquilla con leche en la cámara de condicionamiento 3

Experimento 8

Aparatos.

Cámara de condicionamiento 3. Como se describió en el Experimento 5, es una cámara que consta de dos compartimentos con paredes de acrílico transparente que permiten observar la conducta de los animales mientras realizan la tarea; cada compartimento mide 20cm x 20cm x 20cm y están separados entre sí por una barrera de lámina de 20cm de ancho y 4.5cm de altura colocada a nivel del piso. El piso de ambos compartimentos está formado por una rejilla con tubos de aluminio de 0.2 cm de diámetro, separados por una distancia de 1.0 cm de centro a centro. En el compartimiento B hay una boquilla de bebedero fijado en la parte superior central de la pared más alejada del compartimiento A. La boquilla se encontró en el centro de un cuadro de papel plastificado de 4 cm x 4 cm con rayas negras y blancas impresas de 0.5 cm de ancho. Se colocó una placa metálica aislada eléctricamente del piso de 5 cm x 5 cm justo debajo de la boquilla a nivel del piso. El compartimiento A es aquel en donde no hay boquilla. La cámara de condicionamiento estará localizada en un cuarto sonoamortiguado.

Dipsómetro. Es un aparato electrónico que cuenta el tiempo que permanece cerrado un circuito eléctrico. Dicha información se envía a una computadora y se maneja en un

software diseñado *ad hoc*. El aparato puede manejar 2 circuitos independientes de forma simultánea. El circuito 1 lo constituyen dos partes: la primera, una de las terminales del dipsómetro conectado por un cable a las varillas metálicas que forman el piso del compartimento B de la cámara de condicionamiento 1, las cuales se encuentran conectadas en corto. La segunda parte es el bebedero el cual puede contener leche endulzada, y que tiene una boquilla metálica, la cual se conecta a otra terminal y se encuentra aislada eléctricamente de la parte 1 del circuito, así como de la pared de la cual sale. El circuito se cierra cuando la rata se encuentra sobre el piso del compartimento B y su boca o lengua hacen contacto con la boquilla del bebedero. El segundo circuito lo constituyen el piso del compartimento B, y la placa metálica a nivel del piso (pero aislada eléctricamente del mismo) debajo de la boquilla, así como la pared de donde sale la boquilla. El segundo circuito se cierra cuando la rata se encuentra en el piso del compartimento B, y hace contacto con la pared de la cual emerge la boquilla o con la placa debajo de la misma.

Procedimiento

El experimento consistió en sesiones realizadas cada 24 h: 2 sesiones de preentrenamiento en la cámara de condicionamiento, una sesión de adquisición y una de retención, cada una de 10 min de duración y después de cada una de las cuales las ratas fueron regresadas inmediatamente a su caja hogar. Adicionalmente se permitió a la rata libre acceso al alimento nuevo (leche endulzada) en su caja hogar dentro del bioterio durante toda la noche del día de la primera sesión de preentrenamiento, en un recipiente de vidrio transparente de 6.5 cm de diámetro y 1 cm de altura. La finalidad fue anular algún comportamiento neofóbico en los animales en la sesión posterior de adquisición. Dicho alimento posiblemente posea la propiedad de ser un reforzador positivo aún para ratas alimentadas *ad libitum*.

Cada sesión de preentrenamiento a la cámara de condicionamiento consistió en colocar a la rata en la cámara de condicionamiento 3 en el compartimento A con la cabeza en dirección opuesta al compartimento B y permitirle explorar libremente; la boquilla se mantuvo sin agua.

En la sesión de adquisición se siguió el mismo procedimiento que en el preentrenamiento para el grupo control, mientras que en el grupo experimental se colocó

leche endulzada en el bebedero, y se embarró la parte externa de la boquilla con la misma leche, así como la placa debajo de ésta, para facilitar que las ratas adquirieran la tarea. En la sesión de retención el procedimiento fue similar al de preentrenamiento para ambos grupos.

Se utilizó el tiempo que se mantienen cerrados los circuitos arriba mencionados como medidas del aprendizaje, así como también las latencias para que se cerraran los circuitos (latencia para hacer contacto con la boquilla y latencia para hacer contacto con la pared o la placa en el piso).

RESULTADOS

Los resultados de la figura 8.1 muestran que aunque existe un cambio en el grupo experimental durante en la sesión de adquisición, no hay diferencia significativa entre los grupos en la retención cuando se utilizó el tiempo de contacto con la boquilla como medida de aprendizaje. Lo anterior indica que es posible que no haya habido aprendizaje, o que si lo hubo no se consolidó como memoria a largo plazo; alternatively es posible que hubiese existido una extinción rápida de la tarea durante la sesión de retención de tal forma que el registro de la sesión durante 10 min no hubiese revelado la retención.

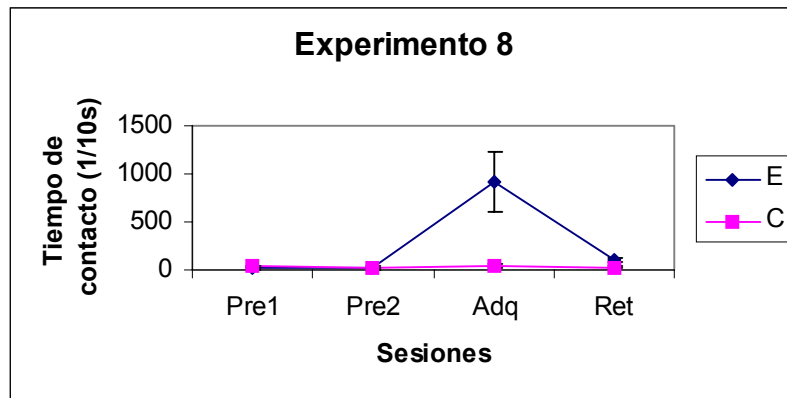


Fig. 8.1. Tiempo de contacto con la boquilla

Sin embargo esta última alternativa pudiera no ser cierta, ya que no existen diferencias significativas en el tiempo de contacto con la boquilla entre ambos grupos durante los primeros 2 min de la sesión de retención cuando se midió a intervalos de 20 s (Fig. 8.2) o como un solo intervalo (Fig. 8.3).

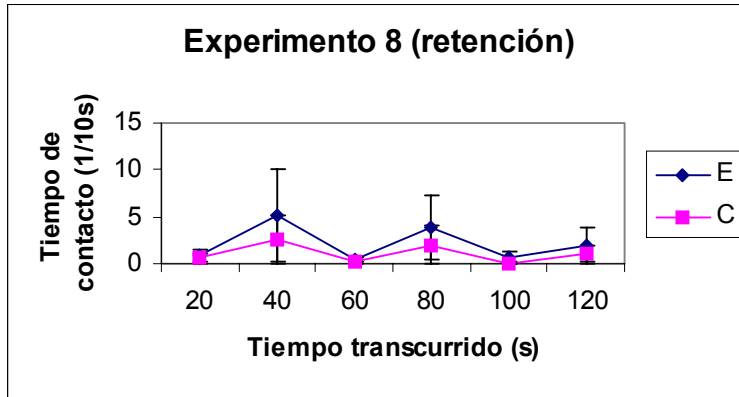


Fig. 8.2. Tiempo de contacto con la boquilla en la sesión de retención a intervalos de 20s.

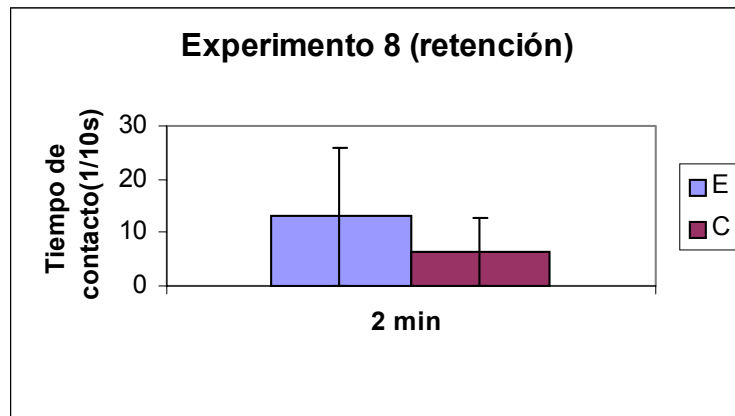


Fig. 8.3. Tiempo de contacto con la boquilla durante los 2 min de sesión de retención.

El tiempo de contacto con la pared y/o la placa debajo de la boquilla como medida de aprendizaje se observa inapropiada, ya que existen diferencias previas entre los grupos antes de la adquisición, y en la retención no se observan diferencias (Figs 8.4 y 8.5).

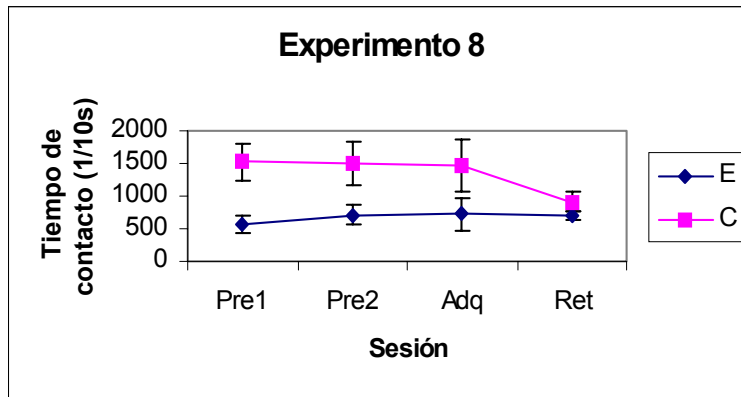


Fig 8.4. Tiempo de contacto con la placa debajo de la boquilla y/o la pared adyacente.

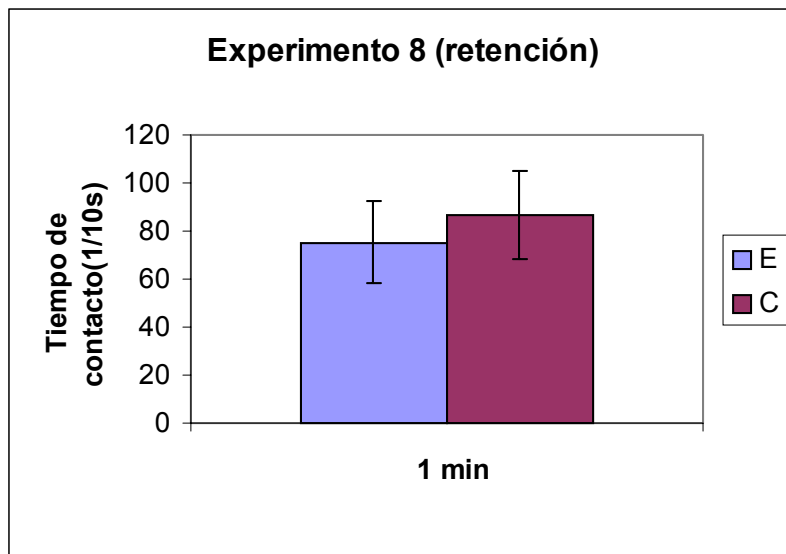


Fig 8.5. Tiempo de contacto con la placa debajo de la boquilla y/o la pared adyacente durante la sesión de retención.

Cuando se mide el tiempo de contacto a intervalos de 10s (Fig 8.6) se observan diferencias durante los primeros 20 s, pero no es posible discernir si se deben a la retención de la tarea ya que primero (a los 10 s) el grupo control tiene valores mayores que el experimental y luego (a los 10 s) a la inversa.

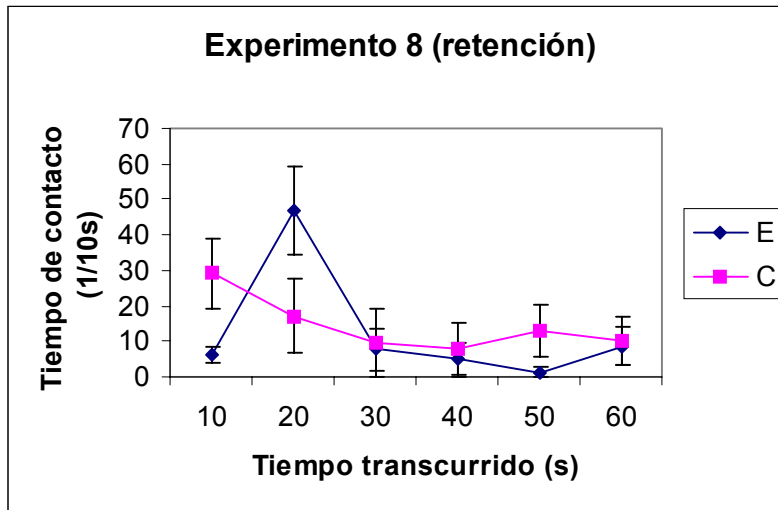


Fig. 8.6. Tiempo de contacto con la placa debajo de la boquilla y/o la pared adyacente durante la sesión de retención a intervalos de 10s

Finalmente no se observaron diferencias significativas en la sesión de retención entre los grupos experimental y control cuando se utilizó como medida de aprendizaje la latencia para hacer contacto con la boquilla (Fig. 8.7) o con la pared y/o placa debajo de la boquilla (Fig. 8.8).

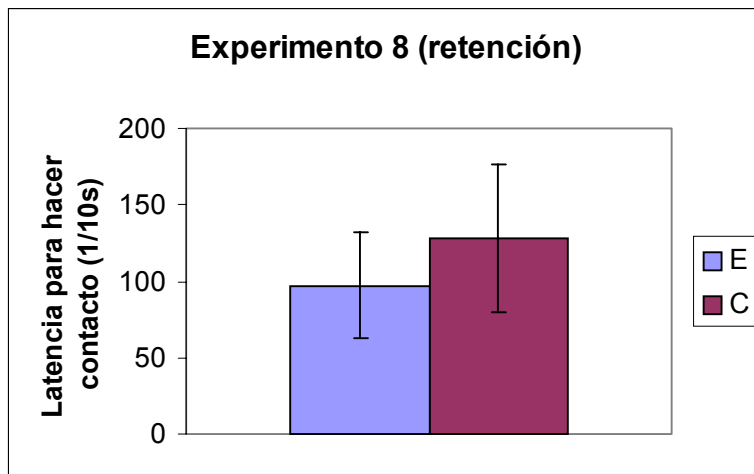


Fig. 8.7. Latencia para hacer contacto con la boquilla durante la sesión de retención

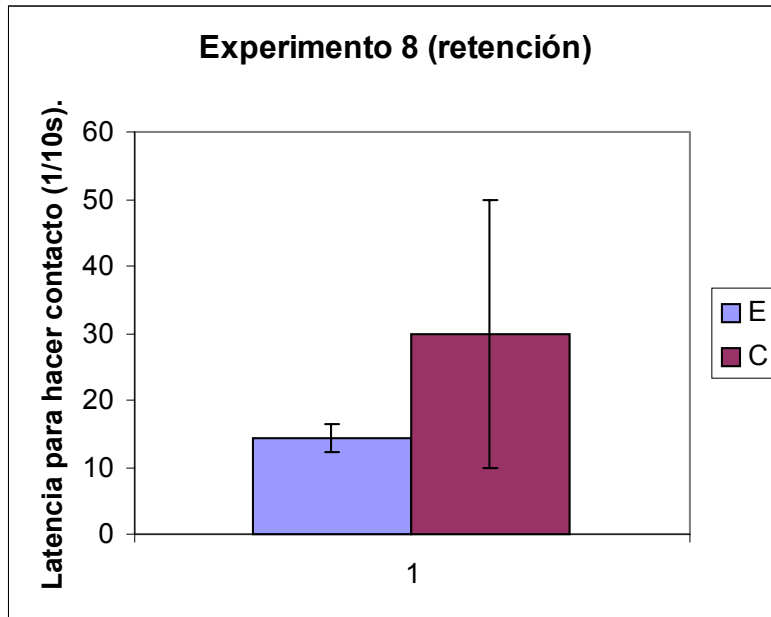


Fig. 8.8. Latencia para hacer contacto con la placa debajo de la boquilla y/o la pared adyacente.

Experimento 9

Aparatos

Se emplearon los mismos que en el experimento 8, con las siguientes diferencias:

- 1.-La boquilla se colocó en una esquina inferior de la misma pared, al igual que la placa metálica debajo de la misma con la finalidad de facilitar la adquisición de la tarea.
- 2.- La cámara de condicionamiento se cubrió con papel celofán rojo para impedir que los animales pudieran ver al observador.
- 3.- Se modificó el segundo circuito para registrar solamente el contacto con la placa metálica a nivel del piso.

Procedimiento

Fue el mismo que el empleado en el experimento uno, excepto que la sesión de retención fue de 1 min para evitar la posible aparición de una rápida extinción. Las medidas de aprendizaje fueron el tiempo de contacto con la boquilla o con la placa en el piso debajo de la boquilla, así como la latencia para hacer contacto con la misma.

RESULTADOS

En este experimento tampoco se observaron cambios significativos entre los grupos en la sesión de retención con cualquiera de las 2 medidas de aprendizaje empleadas (Figs 9.1 y 9.2).

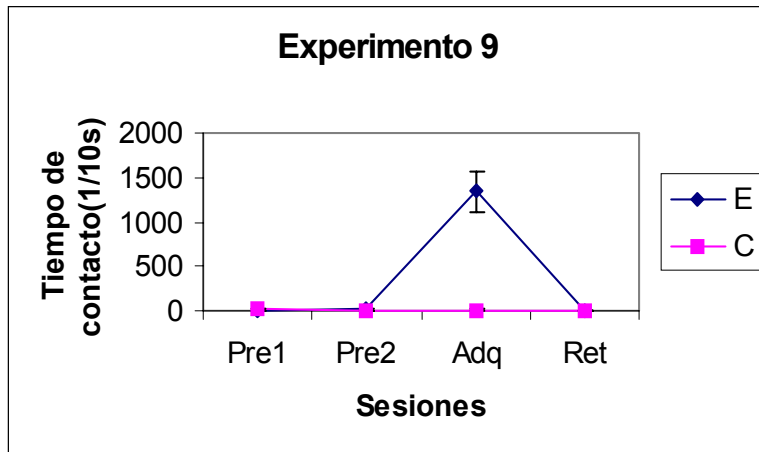


Fig 9.1. Tiempo de contacto con la boquilla

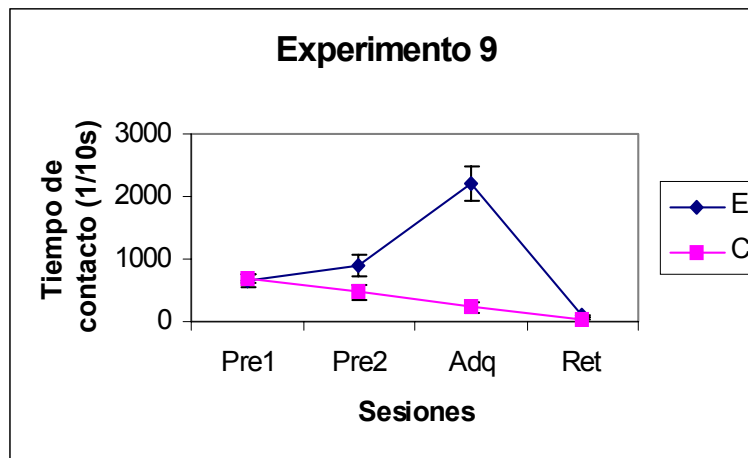


Fig 9.2. Tiempo de contacto con la placa debajo de la boquilla

Dichas diferencias durante el primer minuto en la retención están ausentes cuando se mide el contacto con la boquilla tanto a intervalos de 10 s (Fig. 9.3) como en un solo intervalo (Fig. 9.4).

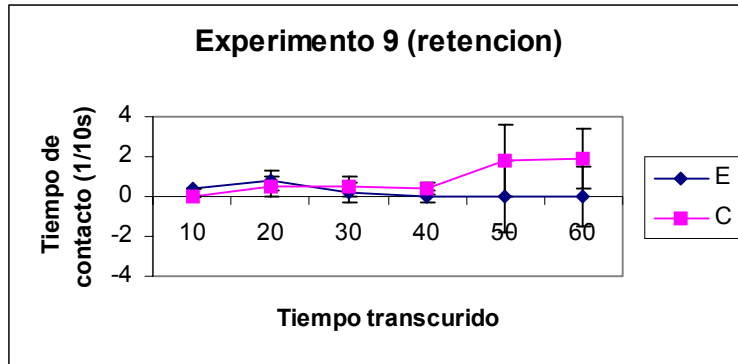


Fig 9.3. Tiempo de contacto con la boquilla durante la sesión de retención a intervalos de 10s

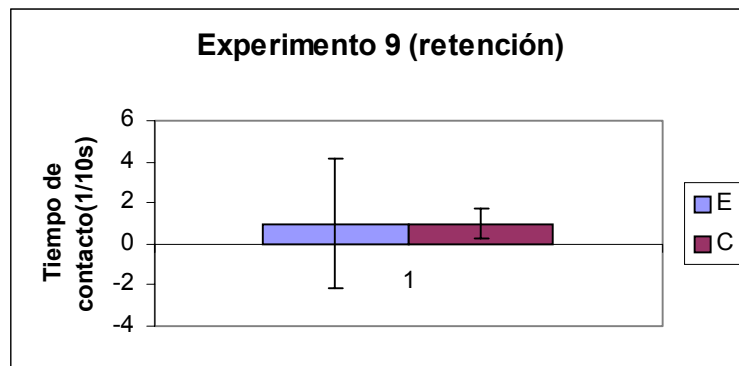


Fig 9.4. Tiempo de contacto con la boquilla durante la sesión de retención

Cuando se utilizó el contacto con la placa debajo de la boquilla como medida de aprendizaje, en la retención se observaron algunas diferencias cuando se registro a intervalos de 10s en la última y antepenúltima de las mediciones (Fig. 9.5), sin embargo dichas diferencias aunque realmente fueran debidas a la retención de la tarea, son muy pequeñas y no son evidentes cuando se mide la retención de 1 min en un solo intervalo (Fig. 9.6), por lo que no se considera este procedimiento el apropiado para los objetivos propuestos.

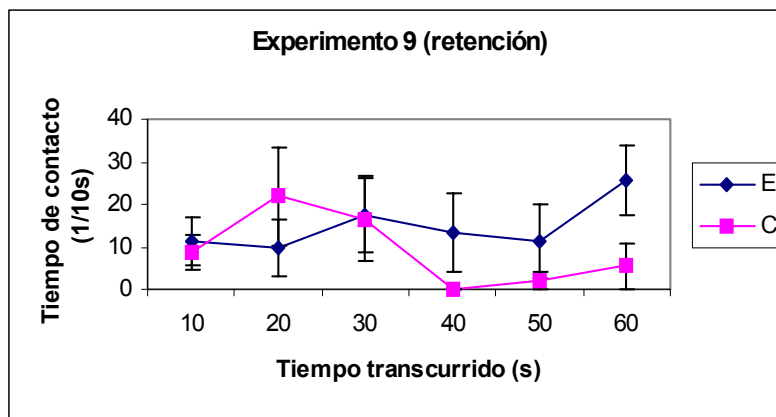


Fig. 9.5. Tiempo de contacto con placa debajo de la boquilla durante la sesión de retención a intervalos de 10s.

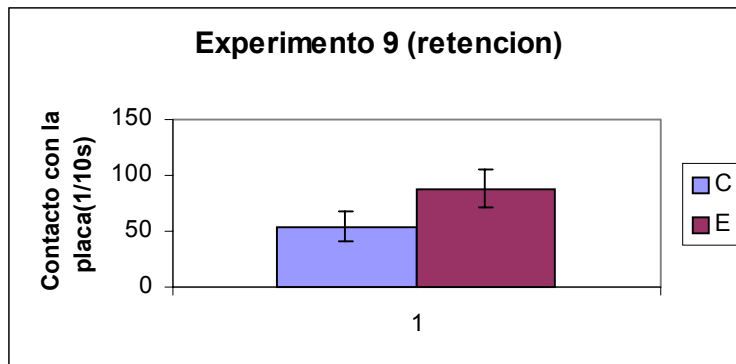


Fig. 9.6. Tiempo de contacto con placa debajo de la boquilla durante la sesión de retención.

Experimento 10

Aparatos.

Se emplearon los mismos aparatos que en el experimento 9, pero se iluminó el compartimiento B con un foco de 15W para reducir la posibilidad de que las ratas que no aprendieron la tarea se acercaran a la boquilla y a la placa debajo de ésta.

Procedimientos:

Se realizaron una sesión de preentrenamiento, una de adquisición y una de retención de forma similar a las realizadas en el experimento 9, pero en virtud de que las ratas alimentadas *ad libitum* parecen no retener la tarea adquirida, se privó a las ratas de agua 23 h previas a la sesión de adquisición, y se les permitió acceso durante 30 min 1h después de ésta, también se privó de agua 23 h antes de la sesión de retención. Como reforzador durante la adquisición se empleó agua en el grupo experimental.

Las medidas de aprendizaje utilizadas fueron la latencia para lengüetear la boquilla, el tiempo de contacto con la boquilla, y el tiempo de permanencia en el compartimiento obscuro.

RESULTADOS

En este experimento no se encontraron diferencias entre el grupo experimental (n = 10) y el control (n = 10) en la sesión de retención cuando se midió el aprendizaje como la latencia para hacer contacto (lengüetear) la boquilla (Fig 10.1).

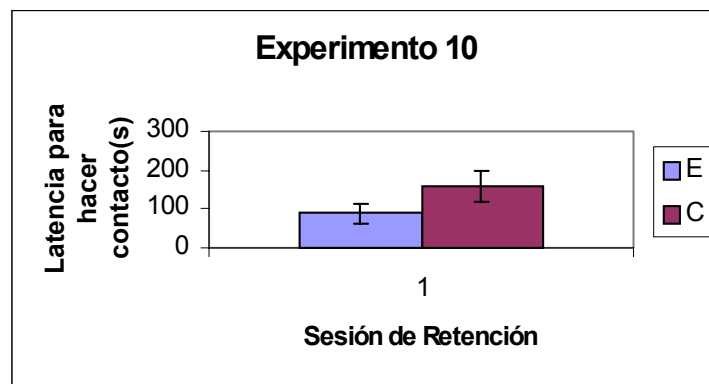


Fig 10.1. Latencia para hacer contacto con la boquilla durante la retención.

Cuando la medida del aprendizaje fue el contacto con la boquilla, se encontró al igual que en experimentos anteriores una diferencia significativa en la sesión de adquisición, pero no así en la retención (Fig 10.2)

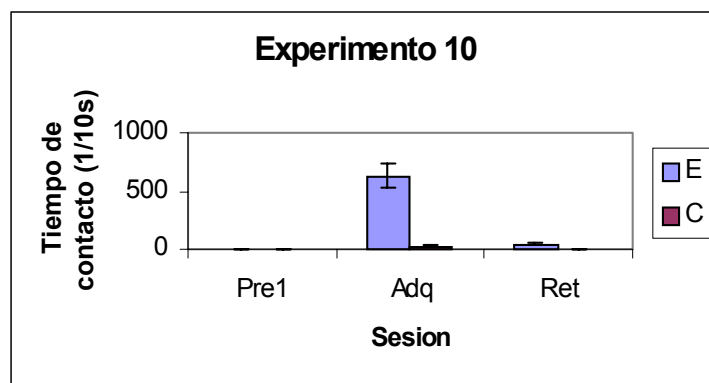


Fig. 10.2. Tiempo de contacto con la boquilla

Cuando se graficó la retención a intervalos de 30 s durante 3 minutos, se alcanzan a observar diferencias en algunos de los últimos registros, lo cual indica que la tarea podría haber sido aprendida y consolidada por el grupo experimental (Fig. 10.3), sin embargo la diferencia entre ambos grupos es muy reducida, lo cual implica el riesgo de que los cambios en la expresión de genes inducidos por dicha experiencia pudieran ser enmascarados fácilmente debido a interferencias ambientales o de otra naturaleza.

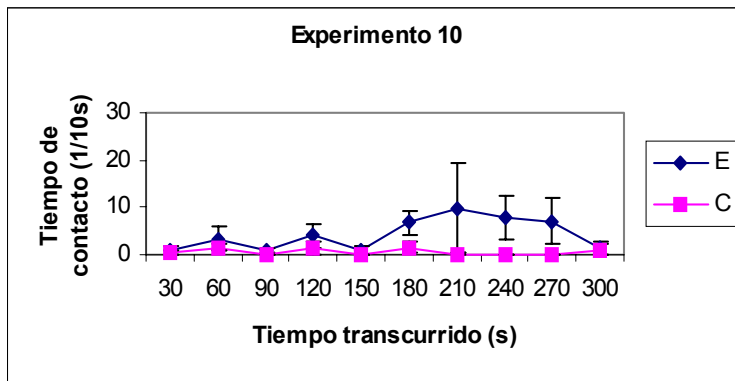


Fig. 10.3. Tiempo de contacto con la boquilla a intervalos de 30s durante la sesión de retención

La preferencia de lugar hacia el compartimento A (oscuro) tampoco mostró diferencias entre ambos grupos durante la retención (Fig. 10.4).

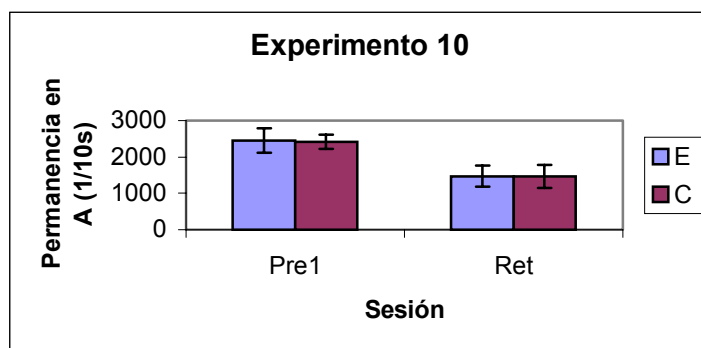


Fig. 10.4. Preferencia de lugar entre los compartimentos de la cámara de condicionamiento

Experimento 11

Aparatos.

Cámara de condicionamiento 4. Es una cámara que consta un compartimento, construido en madera que mide 30cm x 30cm x 30cm y con una tapa de acrílico naranja transparente que permite observar la conducta de los animales mientras realizan la tarea. El piso está formado por una rejilla de tubos de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separados por una distancia de 1.5 cm de centro a centro. En una de las esquinas de la cámara se colocó la boquilla de un bebedero de agua, la cual se conectó al dipsómetro de forma similar a la descrita para el experimento 8. La cámara de condicionamiento se localizó en un cuarto sonoamortiguado.

La finalidad de este experimento fue conocer si los animales podían encontrar el reforzador con mayor facilidad en una cámara de condicionamiento de dimensiones menores, de tal forma que el aprendizaje de la tarea pudiera facilitarse.

Procedimiento.

El experimento consistió en sesiones realizadas cada 24 h, una sesión de preentrenamiento en la cámara de condicionamiento, una sesión de adquisición y una de retención, después de cada una de las cuales las ratas fueron regresadas inmediatamente a su caja hogar. Cada sesión de preentrenamiento a la cámara de condicionamiento consistió en colocar a la rata en la cámara de condicionamiento 4 con la cabeza en dirección opuesta al sitio en donde se colocó la boquilla y permitirle explorar libremente durante 5 min. En la sesión de adquisición se siguió el mismo procedimiento que en el preentrenamiento, pero se puso agua en el bebedero sólo para las ratas del grupo control (n = 10; grupo experimental, n = 10) y se le permitió a la rata ingerir agua durante 5 min contados a partir del momento en que ingirió por primera vez, y en caso de no ingerir en un lapso de 10 min se dio por terminada la sesión. En la sesión de retención el procedimiento fue similar al de preentrenamiento.

Se utilizó el tiempo que se mantuvo cerrado el circuito entre el piso y la boquilla como medida del aprendizaje.

RESULTADOS

Nuevamente, aunque se observan cambios durante la adquisición, en la retención, no hay diferencia entre los grupos control y experimental (Fig. 11.1).

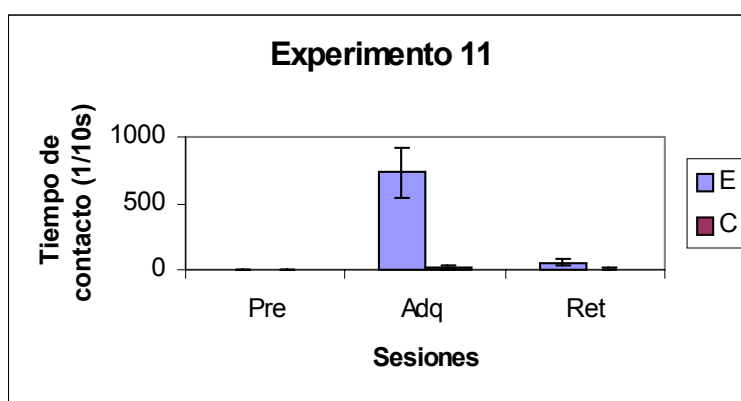


Fig. 11.1. Tiempo de contacto con la boquilla

Experimento 12

A causa del alto porcentaje (aproximadamente 50% del grupo experimental) de ratas que no adquirieron la tarea anterior, se decidió usar un recipiente en lugar de la boquilla del bebedero suponiendo que pudiera ser más fácil para las ratas detectar la presencia de agua en el mismo.

Aparatos

Fueron los mismos que en el experimento 11 con la diferencia de que se colocó un recipiente a 5 cm de altura y de 4.5 cm de diámetro en una esquina de la cámara sobre una base y dentro del recipiente se colocó una placa metálica conectada al dipsómetro en el fondo del recipiente de tal forma que el circuito se cerraba cuando la rata hacía contacto con el agua en el recipiente o con el fondo metálico.

Procedimientos

Fueron los mismos que en el experimento 11.

RESULTADOS

No se observaron diferencias en la retención entre el grupo control (n = 10) como el experimental (n = 10), cuando la medida de aprendizaje fue el tiempo de contacto con el recipiente (Fig. 12.1) o la preferencia de uno de los compartimentos (Fig 12.2).

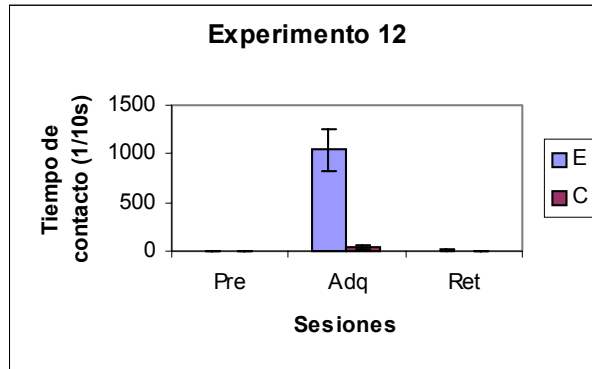


Fig. 12.1. Tiempo de contacto con el recipiente.

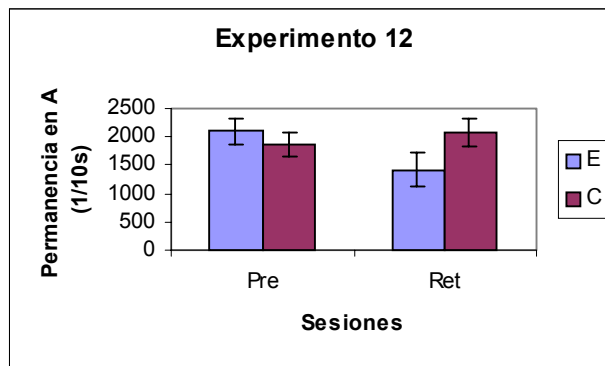


Fig 12.2. Preferencia de lugar entre los compartimentos de la cámara de condicionamiento

Tarea de Evitación Inhibitoria.

Debido a la falta de éxito para lograr que las ratas retuvieran las tareas basadas en reforzadores apetitivos en un ensayo, se exploró la posibilidad de emplear una tarea de evitación inhibitoria.

Experimento 13

Aparatos.

Cámara de condicionamiento de evitación inhibitoria. El condicionamiento se llevó a cabo en una cámara de evitación inhibitoria (Fig. 13.1), que consta de dos compartimentos contruidos en acrílico rojo transparente que permite observar la conducta de los animales mientras realizan la tarea; cada uno mide 30cm x 30cm x 30cm y están separados por una puerta tipo guillotina. El compartimiento de seguridad (A) se encuentra iluminado con un foco de 10 Watts adherido a la tapa, el piso lo forma una lámina de acrílico corrugado de color blanco. El compartimiento de castigo (B), es oscuro, el piso y las paredes lo forman dos láminas de acero que forman una “V” hacia el centro del piso, entre las cuales hay 1.5 cm de separación, mismas que pueden ser electrificadas por encontrarse conectadas a un estimulador de pulsos cuadrados, conectado a una unidad de corriente constante. La cámara de condicionamiento estuvo localizada en un cuarto sonoamortiguado y oscuro provisto de un enmascarador de ruido.

El choque entregado por el estimulador fue de 1.0 mA, con pulsos de 50 ms, frecuencia de 10 pulsos por s y un tren de 5 s de duración.

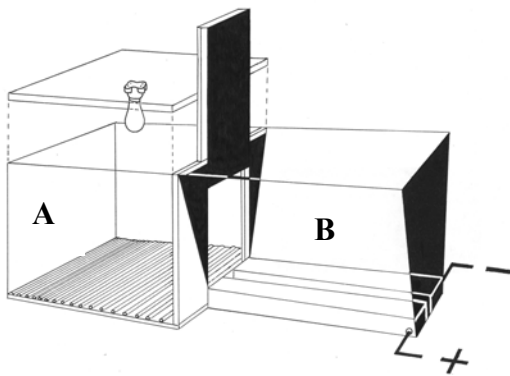


Fig. 13.1. Cámara de evitación inhibitoria.

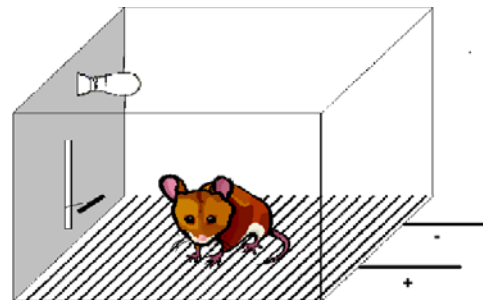


Fig. 13.2. Cámara de choque.

Cámara de choque. Consiste en una caja de acrílico transparente de 25cm de ancho, 30cm de largo y 28 cm de altura, el piso lo forma una rejilla de tubos de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separados por una distancia de 1.5cm de centro a centro, los cuales pueden ser electrificados con el mismo estimulador usado para la cámara de evitación inhibitoria. Esta cámara está localizada en un cuarto sonoamortiguado diferente del de la cámara de evitación inhibitoria (Fig 13.2).

Procedimiento.

La primera parte del procedimiento consistió en la manipulación de los animales (3 a 5 min diarios) durante 2 días previos a la sesión de entrenamiento (adquisición), con el fin de facilitar el manejo de los animales

La sesión de adquisición consistió en introducir al animal en el compartimiento A de la cámara de evitación inhibitoria durante 10 s; una vez transcurridos se abrió la puerta y se registró el tiempo que tarda el animal en pasar al compartimiento B (latencia de entrada). Cuando el animal hubo pasado con las cuatro patas al compartimiento B se cerró la puerta y en ese instante se le administró un choque eléctrico de 1.0 mA durante 5 s; después se abrió la puerta manteniendo el choque encendido otros 5 s, y se le permitió escapar al compartimiento A, registrándose el tiempo transcurrido (latencia de escape); una vez que el animal escapó se le retuvo en el compartimiento A durante 30 s y después se le regresó a su caja habitación y se dio por concluida la sesión.

La sesión de retención consistió en introducir al animal al compartimiento A, esperar 10 s para abrir la puerta y registrar el tiempo en el que el animal pasó al compartimiento B (latencia de retención). En los casos en que el animal ingresó a éste se cerró la puerta sin que el animal recibiera un segundo choque; en ese momento fue sacado y regresado a su caja habitación. Cuando el animal no entró al compartimiento B en 600 s, fue devuelto a su caja habitación.

Se estudiaron 2 grupos, uno experimental (n = 10) y otro control (n = 10). El grupo experimental fue entrenado en la tarea de evitación inhibitoria descrita anteriormente; al grupo control se le aplicó un choque eléctrico (con las características arriba descritas) en las

patas, a través del piso de rejilla de la cámara de choque (Fig 13.2). La duración del choque empleada fue la que recibiera la rata previa del grupo experimental durante el entrenamiento en la evitación inhibitoria y 10 min después se sometió al individuo control al procedimiento de la tarea de evitación inhibitoria pero no se administró choque eléctrico; en los casos en los que el animal no regresó al compartimiento A después de 10s, se le empujó con suavidad al mismo con la mano. El tiempo que permanecieron las ratas en una u otra cámara fue aproximadamente el mismo.

El procedimiento seguido al grupo control tiene la finalidad de descartar los posibles efectos sobre la expresión de genes estriatales debida a la aplicación del choque eléctrico o a la actividad motora desplegada por las ratas en la cámara de evitación inhibitoria. En otras palabras, este grupo se sometió a los mismos estímulos y desarrolló la misma actividad motora que el grupo control, pero no se estableció la asociación choque-respuesta necesaria para el aprendizaje y la subsecuente formación de la memoria. Además en este grupo la rejilla en el compartimiento A de la cámara de evitación pasiva se cubrió con una placa de acrílico, para evitar que pudiera asociar la rejilla con el choque recibido en la cámara de choque.

RESULTADOS

Los resultados muestran que sólo el grupo experimental retiene la tarea, no así el grupo control, tal como es de esperar que ocurra en esta tarea (Fig 13.3).

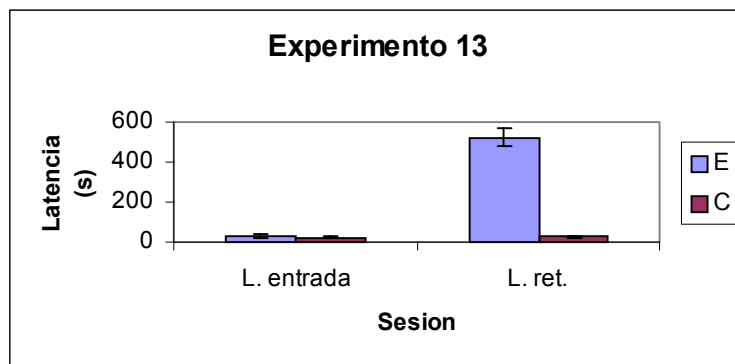


Fig 13.3. Latencias para cruzar al compartimento B durante las sesiones de adquisición (L. entrada) y retención (L. ret).

Experimento 14

Aparatos.

Se emplearon los mismos que en el experimento 13

Procedimiento

Fue similar al empleado en el experimento 13, pero se introdujo a las ratas de ambos grupos a la cámara de choque, en la cual sólo el grupo control (n = 10) recibió choque. Diez min después ambos grupos se sometieron al procedimiento de evitación inhibitoria, pero sólo en el grupo experimental (n = 10) se aplicó el choque.

El objetivo fue que los estímulos recibidos por ambos grupos fueran lo más parecidas entre sí, pero que sólo el grupo experimental pudiera aprender la tarea.

RESULTADOS

Se obtuvieron resultados similares a los del experimento anterior, lo cual indica que la adquisición en el grupo experimental de la tarea no es interferida por la manipulación previa. Por lo anterior se eligió esta tarea como la más adecuada para la consecución del objetivo planteado.

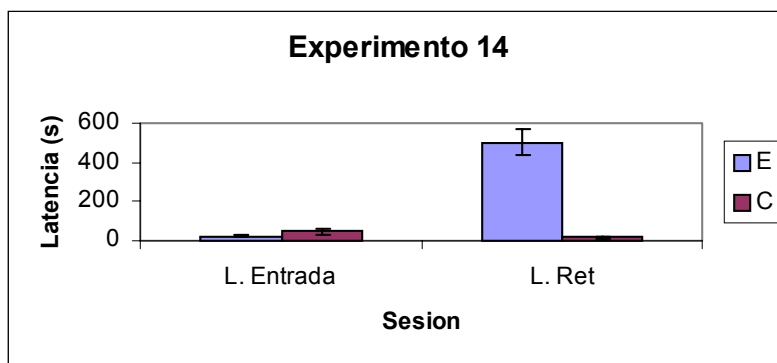


Fig 14.1. Latencias para cruzar al compartimento B durante las sesiones de adquisición (L. entrada) y retención (L. ret).

A lo largo de los ensayos hechos para encontrar una tarea adecuada para el estudio central de este proyecto, encontramos que, a pesar de todos los intentos realizados durante dos semestres, no fue posible implementar una tarea sencilla de aprendizaje, que fuese mediada por reforzadores positivos.

En cambio, la tarea de evitación inhibitoria, utilizada en nuestro laboratorio durante muchos años, demostró, una vez más, ser capaz de inducir un aprendizaje rápido (en un solo ensayo), confiable (excelente retención) y que permite la medición de la memoria de largo plazo. Además, al combinar el uso de la cámara de evitación inhibitoria con la de choque, permite el estudio simultáneo de un grupo control adecuado.

12. APENDICE B. ABREVIATURAS.

A	$(\log_2 \text{ control} + \log_2 \text{ experimental})/2$
AMPA*	Ácido α -amino-3-hydroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
AchE	Acetilcolinesterasa
AKT	Protein cinasa del retrovirus transformante AKT8 que se encuentra presente en células normales y se conoce como PKB
AP5	Ácido 2-amino-5-fosfona pentanoico; antagonista selectivo de receptores glutamatérgicos a NMDA
BDNF *	Factor neurotrófico derivado de cerebro
cAMP*	Adenosin monofosfato cíclico
CaMKII*	Protein-cinasa II dependiente de calcio-calmodulina
Ci	Curie
cDNA*	Ácido desoxirribonucleico complementario
C/EBP*	Proteína de unión al aumentador CCAAT. Es un factor de transcripción
CPM	Cuentas por minuto
CRE*	Elemento de respuesta a cAMP
CREB*	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
CREM*	Modulador del elemento de respuesta a cAMP
dATP*	Desoxiadenosina trifosfato
DCO	Mutante en <i>Drosophila</i> que es deficiente en la subunidad catalítica de la PKA.
dCTP*	Desoxicitidina trifosfato
dGTP*	Desoxiguanosina trifosfato
DNA *	Ácido desoxirribonucleico
dNTP*	Desoxinucleótidos trifosfato
DRB	5,6-dicloro-1-beta-d-ribofuranosilbenzimidazol; inhibidor de la transcripción de la RNA polimerasa II.
dTTP*	Desoxitimidina trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA*	Ácido etilendiamino tetracético
ERK*	Cinasa regulada por señal extracelular
G _s	Proteína G estimuladora
GABA*	Ácido gama-amino-butírico
GAP-43*	Proteína asociada al crecimiento-43
GRK*	Cinasa de receptores acoplados a proteínas G
JNK*	c-Jun amino terminal cinasa. Pertenece a las MAPK's
KRAB*	Caja asociada a Kruppel. Se encuentra dentro de los factores de transcripción tipo Kruppel.
LTP*	Potenciación a largo plazo
M	$\log_2(\text{control/experimental})$
MAPK*	Protein cinasa activada por mitógeno
MMLV-RT*	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
mmol	milimoles
MLP	Memoria de largo plazo
NADPH-diaforasa	Nicotinamida-adenin-nucleótidos fosfato diaforasa

NCAM*	Moléculas de adhesión de células nerviosas
NF-1	Neurofilamentos de cadena ligera
NGF*	Factor de crecimiento de nervios
NMDA	N-metil-D-aspartato
pb	Pares de bases
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa
pCREB	Forma fosforilada de CREB
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA*	Protein cinasa A
PKB*	Protein cinasa B
PKC*	Protein cinasa C
PKG*	Protein cinasa G
Rp-cAMPS*	(Rp)-adenosina 3',5'-monofosfotioato cíclico. Inhibidor de la actividad de la PKA
RNA*	Ácido ribonucleico
RNAm*	Ácido ribonucleico mensajero
RT	Retrotranscripción
RT-PCR*	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
SDS*	Dodecil sulfato de sodio
Sp-cAMPS*	(Sp)-adenosina 3',5'-monofosfotioato cíclico. Activador de la PKA
tPA*	Activador plasminógeno de tejidos
U	Unidades

* Por sus siglas en ingles.