



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

1

FACULTAD DE PSICOLOGIA

**La degradación de proteínas por el proteosoma en la corteza insular
es necesaria para la actualización de la memoria de aversión a
sabores**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

SAUCEDO ALQUICIRA CARLOS FERNANDO

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

REVISORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA E. RUIZ CONTRERAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I.	RESUMEN	6
II.	INTRODUCCIÓN	7
III.	ANTECEDENTES	8
	3.1 Memoria.....	8
	3.2 Consolidación.....	9
	3.3 Re-consolidación.....	15
	3.3.1 Condicionamiento de aversión a los sabores y re-consolidación.....	16
	3.3.1.1 Sustrato neuronal de la memoria de sabor.....	17
	3.3.1.2 Procesamiento del sabor.....	17
	3.3.1.3 Procesamiento del malestar gástrico.....	17
	3.3.1.4 Integración de los estímulos condicionado e incondicionado.....	18
	3.3.1.5 Corteza insular y amígdala.....	18
	3.3.2 Actualización del trazo de memoria.....	21
	3.3.3 Mecanismos de desestabilización del trazo de memoria.....	22
	3.3.3.1 Degradación de proteínas por el sistema ubiquitina proteosoma y	

	estabilización de la memoria.....	27
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVO	
	4.1.Planteamiento del problema y justificación	29
	4.2.Pregunta de investigación.....	29
	4.3.Hipótesis	29
	4.4.Objetivo general	29
	4.5. Objetivos específicos.....	29
V.	MÉTODO	30
	5.1 Sujetos.....	30
	5.2 Cirugía.....	30
	5.3 Procedimiento conductual del CAS.....	30
	5.4 Inyección de cloruro de litio intraperitoneal (LiCl i.p.) y medición del volumen consumido.....	30
	5.5 Experimentos.....	31
	5.5.1 Procedimientos generales.....	31
	5.5.2 Experimento 1.....	31

5.5.3 Experimento 2.....	31
5.5.4 Experimento 3.....	32
5.5.5 Experimento 4.....	32
5.6 Micro inyección.....	32
5.7 Fármacos.....	33
5.8 Pruebas estadísticas.....	33
VI. RESULTADOS.....	34
6.1.Experimento 1.....	34
6.2.Experimento 2.....	35
6.3.Experimento 3.....	36
6.4.Experimento 4.....	37
6.5 Histología.....	38
VII. DISCUSIÓN.....	39
7.1 La inhibición del sistema ubiquitina proteosoma en la corteza insular afecta la re-consolidación del CAS, pero no la consolidación del CAS.....	40

7.2 El efecto de la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma en la corteza insular es específico para la memoria de largo plazo.....	40
7.3 El proceso de reconsolidación como medio para actualizar la memoria.....	41
7.4 Reactivación de la memoria y desestabilización del trazo de memoria.....	42
VIII. LIMITACIONES Y SUGERENCIAS.....	43
IX. CONCLUSIONES.....	43
X. REFERENCIAS.....	44

I Resumen

A partir de un estudio realizado por Nader y colaboradores (2000), en el cual muestra cómo el trazo de memoria es susceptible de ser modificado cuando es reactivado, el campo de la memoria ha incrementado su interés por el estudio de la consolidación. Esta teoría se basa en la hipótesis que para estabilizar el trazo de memoria creado a partir de información novedosa, se necesita del proceso de síntesis de nuevas proteínas. Al ser reactivado, el trazo de memoria ya estable se vuelve susceptible de ser modificado y necesita otra vez de síntesis de nuevas proteínas para re-estabilizarse.

El fenómeno de la re-consolidación se observa en diversos estudios y se han propuesto parámetros para lograr afectar el trazo de memoria utilizando diversas aproximaciones. Algunas de ellas son los inhibidores de la síntesis de proteínas; inhibidores de la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma -un complejo proteolítico multiproteico- o agregando nueva información a la ya existente. Los métodos anteriores necesitan que el trazo de memoria sea reactivado para volverlo vulnerable.

En el campo de la re-consolidación de la memoria se ha propuesto que este proceso es el curso de acción del sistema para actualizar un trazo de memoria. La actualización de la memoria se ha definido como el proceso por el cual un organismo agrega nueva información a un trazo mnémico anterior el cual depende de una nueva síntesis de proteínas para re-estabilizarse.

Además, se ha propuesto que la degradación de proteínas mediante el proteosoma es el mecanismo molecular mediante el cual se lleva a cabo la desestabilización del trazo de memoria cuando es reactivado.

Para probar esta hipótesis se utilizó el paradigma de condicionamiento de aversión a los sabores (CAS), donde se asocia un estímulo condicionado (sacarina), a uno incondicionado (malestar gástrico inducido por LiCl) donde el animal, posteriormente, asocia las propiedades del malestar gástrico con el sabor de la sacarina. Se inyectó en la corteza insular el fármaco lactacistina, el cual es un inhibidor del proteosoma; fue en esa estructura por ser de las principales regiones cerebrales que han sido asociadas al procesamiento del CAS.

El estudio se realizó con dos grupos de ratas; el primer grupo es el grupo control y el segundo fue el experimental. El primer día se realizó un entrenamiento de CAS a los dos grupos; en el segundo día se inyectó en la corteza insular lactacistina al grupo experimental o solución vehículo al grupo control; posteriormente, se realizó un segundo entrenamiento de CAS. En el día 4 se presentó sólo la sacarina a los dos grupos y los animales inyectados con lactacistina no adquirieron el segundo CAS.

Los resultados muestran evidencia de que se tienen que degradar proteínas por el sistema de ubiquitina-proteosoma para incorporar nueva información a un trazo de memoria previa.

II Introducción

El aprendizaje y la memoria nos permiten adaptarnos a nuestro entorno; con ellos incorporamos información del mundo, desde álgebra, manejar, andar en bicicleta o el significado de la palabra “mamá”; la memoria nos permite vivir, tener pasado y futuro y no existir en el presente perpetuo.

Se tienen casos en los cuales, ante la extirpación bilateral de hipocampos por un caso grave de epilepsia como en el caso de H.M., era incapaz de almacenar nueva información. Casos como éste y otros más descritos en artículos de investigación y en libros, como en el del psiquiatra Oliver Sacks y el investigador Antonio Damasio (Damasio, 2007; Sacks, 2001; Sacks, 2002) o las investigaciones de Luria (1973), aportan evidencias contundentes sobre la relación que existe entre los procesos cognitivos y la integridad del cerebro. Las lesiones en alguna zona del cerebro tendrán como consecuencia fallas en un proceso cognitivo determinado.

El caso de Phineas P. Gage ocurrido en 1848, es descrito por Damasio en su libro *El error de Descartes* (Damasio, 2007). En este caso la lesión causada por una barra de metal que entra en forma ascendente por la mejilla, atravesando la zona frontal del cerebro y perforando la parte superior del cráneo, trae repercusiones sobre la personalidad de Gage. Harlow, el médico que atendió a Gage, reportó que horas después del incidente, Gage recordaba el incidente y que lo contaba a los presentes. Veinte años después Harlow realizó un reporte del caso de Gage. En este reporte escribe las características de su paciente después de recuperarse:

“Puede ver, oír, palpar sin sufrir parálisis en ninguno de sus miembros ni en la lengua. Había perdido acuidad en la visión del ojo izquierdo, pero el derecho estaba intacto. Caminaba con firmeza, movía las manos con habilidad y no presentaba dificultades lingüísticas ni idiomáticas. Sin embargo, nos dice Harlow, se destruyó "el equilibrio entre sus facultades intelectuales y sus inclinaciones animales". Los cambios se hicieron patentes apenas terminó la fase aguda de su lesión cerebral. Ahora era "impredecible, irreverente, dado a las expresiones más groseras (lo que antes no había sido su costumbre), manifestaba poca o ninguna deferencia hacia su prójimo; incapaz de contenerse o de aceptar un consejo si se oponía a sus deseos inmediatos, mostraba, junto a una porfiada obstinación, una conducta caprichosa y vacilante; fantaseaba con un futuro improbable, armando castillos en el aire que abandonaba apenas esbozados. Niño en sus manifestaciones y capacidades intelectuales, tenía las pasiones animales de un adulto fuerte". Se recomendaba a las damas no acercarse para evitar ser insultadas por su lenguaje vulgar. Las enérgicas admoniciones de Harlow no tuvieron ningún efecto. Su personalidad cambió tan brutalmente que parientes y amigos apenas lo reconocían. Con tristeza, veían que "Gage ya no era Gage".” Página 28, Damasio (2007).

Otra característica de Gage después del accidente fue el desarrollo de gran apego por cosas y animales, algo que Harlow llamó “conducta de coleccionista”. El caso de Gage

muestra cómo la alteración de la zona frontal del cerebro tiene relación con la personalidad, sobre todo en su capacidad para manejar la inhibición en situaciones sociales.

Un estudio clásico en el que se encuentran relaciones entre lesiones de partes del cerebro y fallas en procesos cognitivos, es el descrito por Paul Broca en 1861. En este estudio muestra cómo un paciente con daño en el tercio posterior del giro frontal inferior presentaba una perturbación motora severa del lenguaje (Luria, 1973) lo que después se conocería como “Afasia de Broca”, en honor a su descubridor.

Como se menciona anteriormente la relación entre la integridad del cerebro y los procesos cognitivos es el caso de H.M. Antes de la aparición de este caso, por influencia de Lashley, se creía que la memoria estaba distribuida por la corteza e integrada con las funciones preceptuales e intelectuales (Squire, 2009). Después del estudio de este caso, se dio un cambio en la percepción del proceso de la memoria, dado que con dicho caso se concluye que hay ciertas partes del cerebro que se encargan de procesar la memoria. A partir de la descripción de este caso, el procesamiento de las funciones preceptuales e intelectuales se separan de la memoria al menos hasta cierto grado (Squire, 2009).

Con el nacimiento de las neurociencias se ha logrado un enfoque multidisciplinario que ha enriquecido nuestro entendimiento de los fenómenos cognoscitivos, asimismo, disciplinas como la biología y la química han revelado los mecanismos fisiológicos que subyacen a los procesos cognoscitivos.

Procesos como la consolidación de la memoria descrita por primera vez en 1900, han sido investigados con mayor profundidad. Ahora se sabe que dos de sus componentes son: el subproceso de síntesis de nuevas proteínas y el subproceso de degradación de proteínas; ambos forman parte de la reorganización que sucede en el sistema nervioso al almacenar nueva información.

En el esfuerzo por comprender mejor el proceso de re-consolidación en nuestro laboratorio estudiamos el sistema ubiquitina proteosoma (UPS), el cual es un mecanismo molecular involucrado en la memoria.

III Antecedentes

3.1 Memoria

La memoria se define como el proceso cognitivo mediante el cual se adquiere, se almacena y se recupera la información derivada de la experiencia (Kandel *et al.*, 2000).

La memoria se ha categorizado en los subprocesos de adquisición, consolidación y evocación. La adquisición es el subproceso por el cual la nueva información se transforma en el trazo de memoria mediante la codificación de la información química, electromagnética o mecánica por los órganos sensoriales (Dudai, 2002). La consolidación es la estabilización progresiva del trazo de memoria que viene después de la adquisición (Dudai, 2004a) y la evocación es el subproceso por el cual un organismo usa la información adquirida.

Sin embargo, nuevos estudios (Bekinschtein, *et al.*, 2007; Nader, 2010), sugieren la existencia de más subprocesos de la memoria, como el mantenimiento y la re-consolidación.

El mantenimiento es el subproceso por el cual la memoria a largo plazo se mantiene por periodos largos de tiempo en comparación con la memoria a corto plazo. Debemos recordar que los periodos de duración de un tipo de memoria no son claros y a veces son arbitrariamente determinados por el experimentador. Concretamente, el proceso de mantenimiento refiere a la presencia de síntesis de nuevas proteínas, entre ellas, la proteína *Factor neurotrófico derivado del cerebro* (BDNF), que está asociada al crecimiento neuronal después que la memoria a largo plazo ha sido formada doce horas después de terminado el condicionamiento (Bekinschtein, *et al.* 2007). Estos procesos de síntesis de proteínas y de requerimiento de BDNF ya se habían observado inmediatamente después de que la memoria se ha formado (Bekinschtein, *et al.* 2007).

Aunque la consolidación y mantenimiento comparten mecanismos moleculares, hay que hacer notar que la diferencia radica en que, el proceso de síntesis de proteínas después de haber formado el trazo de memoria, sucede nuevamente 12 horas después, siendo esto lo que los investigadores llamaron mantenimiento.

Al inhibir la síntesis de proteínas 12 horas después del entrenamiento, se afecta la persistencia del trazo de memoria a los 7 días, pero no a los 2 días. Indicando que el evento de síntesis de proteínas post formación del trazo de memoria sirve para que la memoria persista por más tiempo y difiere del evento de estabilización del trazo de memoria reciente. (Bekinschtein, *et al.*, 2007).

Finalmente la re-consolidación de la memoria es el subproceso mediante el cual el trazo de memoria ya estabilizado entra en un estado de vulnerabilidad después de ser reactivado; una vez reactivado el trazo de memoria, éste es re-estabilizado mediante la síntesis de nuevas proteínas (Nader, 2010).

3.2 Consolidación

Hasta 1880 los estudios sobre memoria se basaban en la introspección y eran sobre todo filosóficos. Para esos años, en Alemania tres psicólogos estudiaron la memoria con un enfoque científico. Uno de ellos fue Hermann Ebbinghaus quien realizó estudios sobre la memoria usando listas de sílabas en 1885, (citado en Lechner *et al.*, 1999) que posteriormente fueron retomadas por Müller y Pilzecker. Estos estudios, realizados entre 1892 y 1900, consistieron en una monografía de 300 páginas y fueron publicados en 1900 (citado en Lechner *et al.*, 1999). Dichos autores realizaron estudios en los que presentaban a voluntarios listas de sílabas sin sentido y tenían que asociar pares de sílabas. En tales experimentos encontraron que había una *persistencia* de ciertas sílabas que no sólo estaban presentes en las respuestas de su clave asociada, sino también en otras claves. Asimismo, observaron que la persistencia disminuía con el tiempo.

Con la observación de este fenómeno concluyeron que hay duraciones diferenciales en los recuerdos de las sílabas, proponiendo que la persistencia era resultado de la

actividad cerebral que codificaba la memoria asociativa y sugirieron que el fenómeno de persistencia funcionaba como memoria a corto plazo. Fue así como Müller y Pilzecker (citado en Lechner, *et al.*, 1999) postularon que la perseveración, es decir, la tendencia a mantener presente sílabas previamente presentadas en otras tareas, también podría ser necesaria para el fortalecimiento de la asociación entre sílabas, dando pie al descubrimiento de la inhibición retroactiva y el fenómeno de la consolidación.

La inhibición retroactiva significa que cuando observaron el recuerdo de la información presentada primero (llamémosle lista A), disminuía después de ser presentada otra lista de palabras (lista B), y señalaron que esto era probable que se debiera a que, la segunda lista interfería con los procesos fisiológicos responsables del fortalecimiento de asociación entre las sílabas de la primera lista y debilitaba la tendencia a perseverar dentro del sistema nervioso de la primera lista.

Müller y Pilzecker (citados en Lechner, *et al.*, 1999), señalaron que el poder de interferencia de la nueva información sobre la información pasada tiene una relación inversamente proporcional con el tiempo, postulando que la memoria debería de consolidarse dentro de los primeros 10 minutos, ya que los errores cometidos por los sujetos del experimento eran pocos en comparación con tiempos anteriores, por lo tanto la información después de haber pasado 10 minutos se consideraba estable a largo plazo. Con lo anterior aportaron evidencia de la distinción entre memoria de corto plazo y memoria de largo plazo.

Después de la publicación de la monografía de Muller y Pielzecker, se notó que ésta hipótesis daba cuenta del fenómeno de amnesia retrógrada (McGaugh, 2000). La hipótesis fue ignorada por casi cincuenta años, hasta que dos estudios mostraron cómo choques electroconvulsivos causaban amnesia retrógrada en ratones (McGaugh, 2000).

En 1949, Donald Hebb (citado en Lechner, *et al.*, 1999), aportó un postulado a la teoría dual de la memoria, la cual propone que la memoria a corto y largo plazo son independientes. Este postulado le adjudica a la memoria a corto plazo la actividad de reverberación dentro de los circuitos neuronales locales como el sustrato de la memoria. Éste efecto de reverberación produciría cambios estructurales en la sinapsis y en la red que reverbera hasta que ocurra el crecimiento y la memoria sea almacenada por más tiempo (Dudai, 2002). Siendo éste el supuesto clave de la teoría dual de la memoria: algún cambio era requerido entre las uniones de las neuronas para estabilizar el trazo de memoria (Rodríguez J. C., *et al.*, 2007; Brown, *et al.*, 2003). El mecanismo propuesto por Hebb permitiría que un trazo de memoria a corto plazo inestable fuera seguido por un trazo de memoria a largo plazo estable (Rodríguez J. C., *et al.*, 2007; Dudai, 2004 a). Este razonamiento cambió la forma de estudiar la consolidación de la memoria, ya que implicaba la ocurrencia de cambios en la sinapsis a corto plazo, induciendo reestructuración morfológica y/o química, permitiendo que el trazo de memoria se almacenara a largo plazo. Este último postulado sugería la participación de síntesis de proteínas en la estabilización de la memoria, que después se comprobó experimentalmente (Arganoff, *et al.*, 1965; Flexner 1963 citado en Lechner, *et al.*, 1999). Aunado a la implicación del postulado de Hebb, había la creencia de que la

memoria de alguna forma podía depender de ácidos nucleicos o proteínas (Flexner, *et al.*, 1962).

Entre estos estudios donde se inhibía la síntesis de proteínas para poner a prueba la naturaleza bioquímica de la consolidación, está el realizado por Flexner en 1963 (citado en Lechner, *et al.*, 1999). En tales experimentos se inyectaron intracerebralmente (directamente en el hipocampo y en las zonas temporales adyacentes), o sistémicamente inhibidores de la síntesis de proteínas minutos después del aprendizaje.

Se encontró que el bloqueo de la síntesis de proteínas interfirió con la consolidación de la memoria, sin intervenir en la percepción o en la evocación de la memoria de largo plazo, una vez consolidada la memoria (Dudai, 2004a).

El término consolidación se refiere a dos procesos:

El primero –consolidación sináptica- se lleva a cabo en las sinapsis que almacenan las representaciones dependientes de experiencia (Dudai, 2004a).

El segundo proceso –consolidación de sistemas- lleva semanas, meses o años en completarse (Dudai, 2004a). Se cree que la consolidación involucra la reorganización de los sistemas cerebrales que almacenan la memoria y en el curso, el trazo se puede trasladar a otras áreas cerebrales dependiendo de los circuitos que estuvieron involucrados en su almacenamiento (Dudai, 2004a). Así es como la memoria deja de ser dependiente de hipocampo.

De acuerdo a esta serie de estudios, la diferencia entre memoria a corto plazo y memoria a largo plazo radicaba en que sólo la memoria a largo plazo pasa por la consolidación (Dudai, 2004b), el cual es un proceso que permite la estabilización del trazo de memoria y lo hace perdurar en el tiempo. Es por este proceso que la memoria a corto plazo, a diferencia de la memoria a largo plazo, decae rápidamente (Lechner, *et al.*, 1999).

La evidencia anterior nos sugiere que sin el evento de estabilización, la información no sería duradera y/o sería propensa a ser alterada. Sin embargo, uno de los principales argumentos en contra de los estudios con inhibidores de la síntesis de proteínas son los efectos inespecíficos que causa la infusión de inhibidores de la síntesis de proteínas, que podrían dar cuenta del efecto sobre la memoria.

Se ha reportado que la inyección de estos fármacos puede causar actividad neuronal anormal y alteraciones en la liberación de neurotransmisores (Gold, 2008). Algunos de estos efectos podrían afectar el funcionamiento normal de las células, observándose un efecto parecido a la amnesia.

La pregunta que surge ante ésta evidencia es: ¿es éste procedimiento un artefacto? Es decir, una inhibición de la síntesis de proteínas es inespecífica y no permite discernir entre los efectos secundarios y los mecanismos bioquímicos de la memoria. Otro punto importante de estos estudios es que la evidencia no puede diferenciar entre déficits en la evocación de la memoria y el almacenamiento de la información. No se puede diferenciar entre estos estudios porque hay dos explicaciones ortogonales. Si la postura sobre déficits en el almacenamiento es correcta, entonces no debería de ocurrir recuperación de la memoria, pero se podría argumentar que las claves adecuadas para promover el recuerdo no han sido usadas.

Es por esto que un equipo de investigación resolvió el problema, inclinando la balanza hacia el lado del almacenamiento y no en la evocación de la información (Hardt *et al.*, 2009). Este grupo de investigadores diseñaron un experimento, con el cual proponen diferenciar entre dos los eventos de amnesia inducida y ausencia de recuperación de la información. Para esto, los autores sugieren que el experimento debe tener las características de poder diferenciar empíricamente, entre el efecto amnésico y fallas en la recuperación de la información. La diferenciación empírica entre ambos procesos debe estar equipada de tal forma que, las predicciones entre ambos procesos sean contrarias.

En este paradigma toman como punto de partida el hecho de que los receptores al neurotransmisor glutamato NMDA (N-metil D aspartato), son necesarios para aprender el primer ensayo del paradigma conductual de condicionamiento contextual al miedo, pero no el segundo.

Para abordar este problema este grupo de investigadores bloquearon la actividad de los receptores NMDA, con el fármaco AP5, un antagonista de estos receptores. Las predicciones para la propuesta teórica que apoya la postura que el fenómeno es producto de la amnesia son: si los procedimientos experimentales provocan amnesia, entonces la información del primer ensayo no estará disponible en el segundo ensayo. Experimentalmente, se observará que si hay amnesia, entonces la administración de AP5 bloqueará el aprendizaje del segundo ensayo. Esto se probó en el paradigma de condicionamiento al miedo en que se mide la conducta de congelamiento.

Como se muestra en la Figura 1, la administración de AP5 afecta el almacenamiento del primer ensayo (grupo AP5/Veh), pero no del segundo ensayo (grupo Veh/AP5), y bloquea el almacenamiento de ambos ensayos en el grupo que se le administró AP5 las 2 veces (grupo AP5/AP5), indicando que los efectos sobre el almacenamiento por inhibición de los receptores NMDA por AP5 es selectiva del primer ensayo.

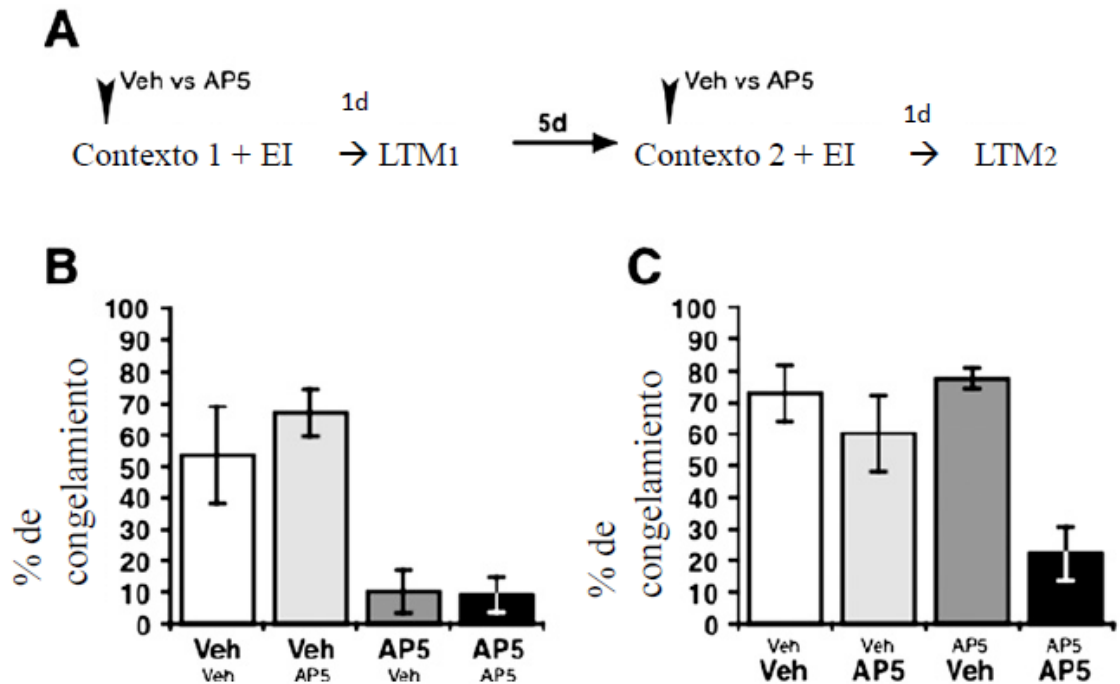


Figura 1. En la parte superior se muestra el diagrama del experimento (A). Los animales fueron inyectados con AP5 o solución vehículo (Veh) después de ser entrenados en el paradigma conductual de condicionamiento contextual al miedo. Los animales fueron inyectados nuevamente con AP5 y Veh 5 días después antes del segundo entrenamiento y los resultados se observan en (B). Los animales inyectados con AP5 muestran problemas en el almacenamiento del primer ensayo, grupos AP5/Veh y AP5/AP5. Cinco días después, se repitió el mismo procedimiento pero en un contexto diferente. Los resultados se muestran en (C). La inyección de AP5 no afecta a los grupos con memoria intacta del primer ensayo, pero afecta de nuevo a los animales con amnesia del primer ensayo, grupos Veh/AP5 y AP5/AP5 correspondientemente. (Modificada de Hardt, *et al.*, 2009)

Posteriormente, los investigadores repitieron el experimento anterior pero usando anisomicina un inhibidor de la síntesis de proteínas con la característica de tener efectos amnésicos. Como se observa en la Figura 2, la inyección de anisomicina vuelve susceptible al animal a los efectos del AP5, al momento del segundo ensayo (grupo ANI/AP5), indicando que los efectos de la anisomicina son amnésicos, ya que si la información del primer ensayo estuviera presente, la inyección de AP5 en el segundo ensayo no tendría efecto.

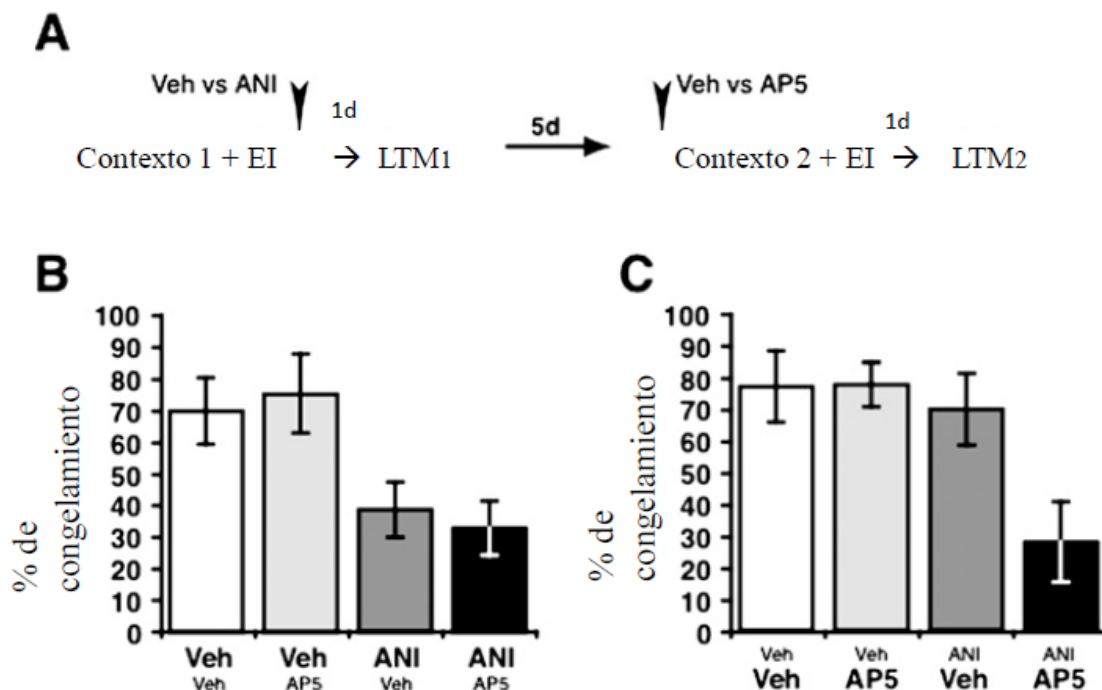


Figura 2. En la parte superior se muestra el diagrama del experimento (A). Los animales fueron inyectados con anisomicina o solución vehículo después de ser entrenados en el paradigma conductual de condicionamiento contextual al miedo. Un día después, se realizó la prueba y los resultados se observan en (B). Los grupos inyectados con anisomicina muestran amnesia del primer ensayo, grupos ANI/Veh ANI/AP5. Cinco días después, se inyectó AP5 o solución vehículo antes de ser entrenados en el paradigma de condicionamiento contextual al miedo pero en un contexto diferente. Los resultados se muestran en (C). Los animales inyectados con anisomicina en el primer ensayo son susceptibles a los efectos de AP5 en el segundo ensayo, grupo ANI/AP5. (Modificada de Hardt, *et al.*, 2009)

Como mencionamos anteriormente, la infusión APV que bloquea sólo la adquisición del primer entrenamiento del condicionamiento al miedo se muestra este efecto en animales previamente inyectados con anisomicina, se concluye que los efectos de la inyección de anisomicina sobre la memoria son en el almacenamiento de la información.

En cuanto a la aplicación de estos conocimientos en el campo de la salud, el interés principal se da por el gasto que eroga el Estado en la cura de las enfermedades que causan estrés post traumático, las adicciones o las fobias; los profesionales en la salud, entre ellos los médicos, psiquiatras, psicólogos y psicoterapeutas son los más interesados en la susceptibilidad de la alteración de la memoria. En el futuro, esta línea de investigación podría ser usada en el tratamiento de padecimientos de memoria, mejorando la calidad de vida de los individuos.

3.3 Re-consolidación

En los últimos años se ha renovado el interés por el estudio de la etiología de la amnesia y de la consolidación, debido al descubrimiento en donde los trazos de memoria son susceptibles de ser modificados al ser reactivados (Nader, *et al.*, 2000; Artinian, *et al.*, 2008; Lee, 2008a; Lee, *et al.*, 2008b). Específicamente, el estudio realizado por Nader y colaboradores en el 2000, en el que usaron el paradigma de condicionamiento auditivo al miedo, devolvió el interés sobre el estudio de la naturaleza de la consolidación.

En este estudio muestran que una memoria ya consolidada se vuelve susceptible a los efectos amnésicos de los inhibidores de la síntesis de proteínas al reactivar la memoria. La memoria es reactivada al presentar el estímulo condicionado. En la Figura 3 se muestra cómo el trazo de memoria es vulnerable a los efectos de la anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, sólo cuando se presenta el tono, que funge como estímulo condicionado.

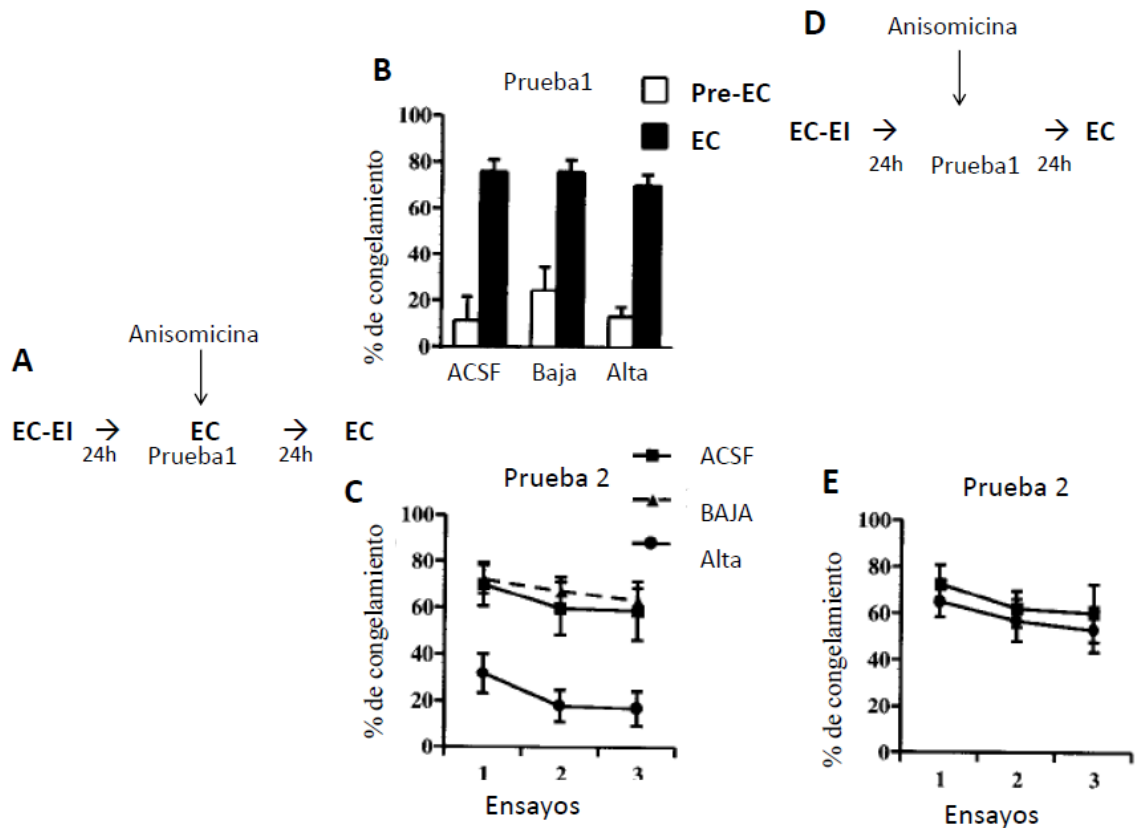


Figura 3. Los grupos están divididos en líquido cefalorraquídeo artificial y se muestran en cuadrados (ACSF 0.5 microlitros por cada lado), en triángulos anisomicina en concentración baja (6.2 microgramos por cada 0.5 microlitros por cada lado) y en círculos anisomicina en concentración alta (62.5 microgramos por cada 0.5 microlitros por cada lado). En la parte de arriba se muestra el esquema del experimento (A). Entrenan a los animales en la tarea de condicionamiento de auditivo al miedo, 24 horas después realizan la prueba

que consiste en poner al animal en la caja en la que fue entrenado y presentar el tono, 24 horas después realizan la segunda prueba. En (B) observamos los resultados de la primera prueba y las gráficas están en porcentaje de congelamiento. Se presentan las mediciones para antes del estímulo condicionado (blanco) y después del estímulo condicionado (negro) No se observan diferencias entre los grupos indicando que todos los grupos adquirieron el ensayo, al tener un porcentaje de congelamiento mayor después de la presentación del estímulo condicionado. En (C) se muestra que sólo los animales inyectados con una dosis alta de anisomicina presentan amnesia del condicionamiento En (D) se muestra el esquema del experimento dos que sólo difiere del primero, en que no se presenta el tono al momento de la prueba. Los resultados de este experimento se muestran en (E). No hay diferencias entre los grupos, indicando que la inyección de anisomicina no causa amnesia del primer ensayo, si no se presenta el estímulo condicionado (Modificada de Nader, et al., 2000)

Este tipo de estudios involucraron en un principio el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas con la reactivación de una conducta previamente consolidada. Al principio de esta nueva serie de estudios se creía que la re-consolidación era una recapitulación de la consolidación, pero como lo han demostrado diversos trabajos, entre ellos los de Berman, *et al* (2001) y Lee, *et al* (2004), no sólo son molecularmente diferentes, sino que el periodo de decaimiento de la plasticidad también es diferente (Nader, 2009), es decir, la evidencia sugiere que, la consolidación perdura por más tiempo que la re-consolidación.

Un gran número de experimentos relacionados con la re-consolidación se han realizado con diferentes organismos: nemátodos, ratas, humanos, pollos, caracoles; con diversos protocolos conductuales, entre ellos, el condicionamiento auditivo al miedo, memoria espacial, condicionamiento clásico, habituación y con diferentes fármacos: inhibidores de la síntesis de proteínas, antagonistas de los receptores no-NMDA a glutamato, antagonistas de los receptores NMDA, interferencia por medio de nuevo aprendizaje, inhibidores de la síntesis de RNA, transgénicos de Zif 268 (Nader, 2009), lo que indica que la re-consolidación es un proceso general de las memorias, pero que requieren de ciertas condiciones para que se lleve a cabo. En nuestro laboratorio se han realizado experimentos para evaluar la consolidación y re-consolidación usando el paradigma de condicionamiento de aversión a los sabores (García de la Torre, *et al.*, 2009).

3.3.1 Condicionamiento de aversión a los sabores y re-consolidación

El condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) es un condicionamiento clásico, el cual consiste en asociar un sabor con malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni, 2004). Una de las ventajas metodológicas que presenta el CAS es que se pueden asociar los estímulos hasta con cuatro horas de diferencia en la presentación; se puede lograr una

aversión fuerte con sólo un ensayo y las vías de procesamiento han sido descritas en varios estudios anatómicos y neurofisiológicos (Bermúdez-Rattoni, 2004).

La forma de medir el CAS es con el volumen de consumo por la rata del sabor aversivo en porcentaje del volumen consumido por una línea base. La inyección de LiCl intraperitonealmente, hace que el consumo del sabor disminuya (Bermúdez-Rattoni, 2004). Una de las estructuras reportadas que contribuyen en el procesamiento de la memoria de sabores es la corteza insular (Bermúdez-Rattoni, 2004) y también se ha descrito su participación en la consolidación y re-consolidación del CAS (García de la Torre, *et al.*, 2009), se ha probado que la inhibición de proteínas en esta estructura afecta la re-consolidación del CAS (García de la Torre, *et al.* 2009) y cuando se inhibe conjuntamente la síntesis de proteínas en la amígdala central y la corteza insular se afecta la consolidación del CAS (García de la Torre, *et al.* 2009), (Figura 4).

3.3.1.1 Procesamiento del sabor

El procesamiento del sabor inicia con la transducción química del sabor en la cavidad bucal, a partir de los 200 ms la rata puede discriminar entre un nuevo sabor y agua (Bermúdez-Rattoni, 2004). La vía que sigue el procesamiento del sabor a partir de la lengua, transmite la información hacia la parte rostral del núcleo del tracto solitario mediante los pares craneales VII (facial), IX (glossofaríngeo) y desde la laringe y faringe a través del nervio X (vago). Las neuronas del núcleo del tracto solitario proyectan de forma ipsilateral a la zona posteromedial del núcleo parabraquial (PBN); de este núcleo salen proyecciones al hipotálamo lateral, la amígdala central y basolateral y el núcleo ventroposteriomedial del hipotálamo que proyecta a la corteza insular. Aunado a las proyecciones antes mencionadas, del PBN, existe transmisión de información a la zona parvocelular de la parte de ventroposteromedial del tálamo (VPM). Del VPM salen fibras que proyectan a la corteza insular. El núcleo basal magnocelular manda aferencias colinérgicas a la amígdala y a la corteza insular (Bermúdez-Rattoni, 2004).

3.3.1.3 Procesamiento del malestar gástrico

Hay dos formas posibles de procesamiento del malestar. La primera es mediante el nervio vago, y es un malestar directamente inducido sobre la víscera. La segunda se detecta por vía sanguínea y llega al área postrema, área con una barrera hematoencefálica con mayor permeabilidad que la mayoría de las áreas cerebrales; de ahí emergen proyecciones hacia la zona caudal del núcleo del tracto solitario, las dos vías llegan a la parte caudal del núcleo del tracto solitario, a la parte lateral del núcleo parabraquial, la amígdala central y el núcleo paraventricular del hipotálamo.

3.3.1.4 Integración de los estímulos condicionado e incondicionado

La base de las modificaciones de las respuestas neuronales al estímulo condicionado después del CAS, son los cambios plásticos en las neuronas, que resultan de la asociación entre el estímulo condicionado y el incondicionado (Yamamoto, *et al.*, 2007).

Ambos estímulos convergen en estructuras afines, en donde se podría dar la asociación del malestar gástrico con el sabor formando el trazo de memoria. Algunas de esas estructuras son el núcleo de parabraquial, el núcleo del tracto solitario, la corteza entorrinal y la corteza frontal. Sin embargo, la corteza insular se ha probado como específico de este tipo de memoria.

Se ha establecido que el procesamiento del malestar gástrico es dependiente de la amígdala (Bermúdez-Rattoni, 2004) y que el procesamiento del sabor e integración de los estímulos se da en la corteza insular (Bermúdez-Rattoni, 2004). Lo cual se describe a continuación

3.3.1.5 Corteza insular y amígdala

La corteza insular se clasifica en tres regiones por su citoarquitectura: granular, disgranular y agranular. Cada una de ellas se divide en tres capas: la superficial, la media e interna, siendo ésta la capa más medial.

Ha sido reportada la función de la corteza insular en el procesamiento de información gustativa en la rata y también ha sido descrito su papel en la consolidación del condicionamiento de aversión al sabor, extinción del CAS y en la atenuación de la neofobia (Berman, *et al.*, 2001; Bermúdez, 2004; Rodríguez, *et al.*, 2005).

Existe un gran cúmulo de evidencia que proviene de diversos métodos que marcan la importancia de la corteza insular en el CAS. Una muestra son los estudios electrofisiológicos, como el realizado por Escobar *et al.*, (2000) en el que muestra que la inducción de LTP en la corteza insular potencia la retención del CAS.

Estudios con otras aproximaciones muestran que es necesaria la fosforilación de la subunidad NR2B del receptor a glutamato NMDA para que se lleve a cabo el aprendizaje del CAS (Yamamoto, *et al.*, 2007).

Finalmente, un estudio realizado por Shema, *et al.* (2007) muestra la participación de la corteza insular en el almacenamiento de la memoria, al bloquear la actividad de la PKMZ, que es una isoforma de la proteína cinasa C, involucrada en el mantenimiento de la memoria. Al bloquear la actividad de la PKMZ, observaron que tenía efecto amnésico sobre la información ya consolidada del CAS (Shema, *et al.*, 2007)

La amígdala es la otra estructura que participa en la memoria de aversión a los sabores, al procesar la información sobre aspectos emocionales en la ingesta de comida y agua. Se divide en los subnúcleos: basal, lateral, central y cortical. La amígdala basolateral, recibe proyecciones de la corteza piriforme que se dirigen hacia la corteza insular y la corteza entorrinal. La amígdala central recibe una variedad de aferencias corticales de la corteza entorrinal, la corteza insular y la corteza perirrinal.

La amígdala basolateral (BLA) y la amígdala central (CeA), son estructuras con participación ya reportadas en el procesamiento de la memoria de sabores; concretamente, se ha asociado su participación en el procesamiento del malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni, 2004).

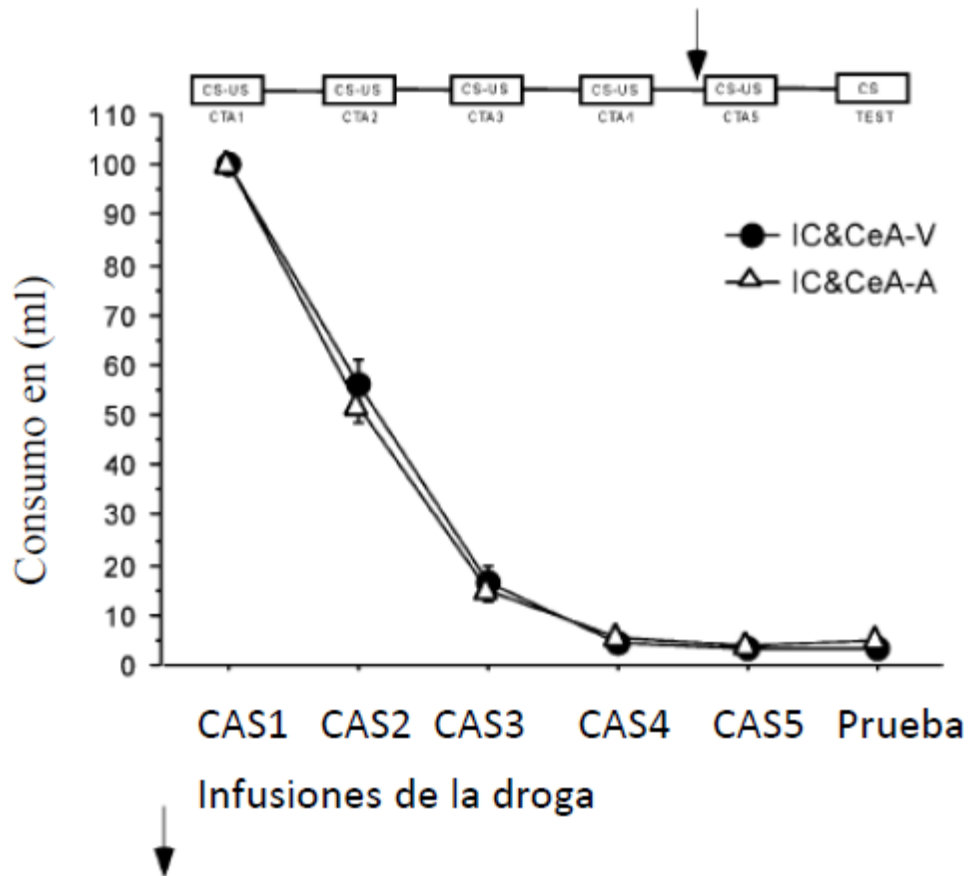


Figura 4. Infusión conjunta de anisomicina en la corteza insular y la amígdala central en asíntota conductual. En la parte de arriba se muestra un esquema del experimento. Una hora antes del quinto ensayo de CAS se inyectó simultáneamente líquido cefalorraquídeo artificial (círculos) o anisomicina (triángulos) en la corteza insular y en la amígdala central. La prueba fue hecha un día después. La memoria de aversión a los sabores no es afectada por infusión de anisomicina en la corteza insular y el núcleo central de la amígdala cuando no se presenta información novedosa. Estímulo condicionado (CS) y estímulo incondicionado (US); la flecha señala el momento de la inyección. Condicionamiento de aversión a los sabores (CTA por sus siglas en inglés: Conditioned Taste Aversion), inyección de anisomicina en la corteza insular y en la amígdala central (IC&CeA-A), inyección de vehículo en la corteza insular y la amígdala central (IC&CeA-V) (Modificada de García de la Torre, et al., 2009).

La información anterior muestra la importancia de los mecanismos moleculares de la plasticidad cerebral y de cómo el cerebro está continuamente remodelándose para incorporar la nueva información derivada de la experiencia, para que constantemente aprendamos.

Además, muestra que el sistema no lleva a cabo siempre el mismo gasto de recursos necesarios para estabilizar el trazo de memoria. Esto apunta a preguntas sobre ¿cómo logra el sistema mantener la información si se está remodelando continuamente? ¿Qué mecanismo(s) procesan la desestabilización del trazo de memoria? En el apartado siguiente abordaremos la última pregunta y se presentarán uno de los mecanismos de los que se tiene conocimiento.

En la literatura se ha reportado que la re-consolidación depende de ciertos parámetros, no basta presentar un estímulo para reactivar la memoria y que entre en un estado de vulnerabilidad (Forcato *et al.*, 2009).

Recientemente, Forcato y su grupo de trabajo (2009) han propuesto algunos parámetros para que ocurra la re-consolidación. Estos son:

1.- La vulnerabilidad del trazo de memoria al ser reactivado. Es decir, que sea susceptible a ser afectado; esto se puede observar si ocurre amnesia o la no incorporación de nueva información al trazo de memoria existente.

2.- La especificidad de la estructura del recuerdo, esto es:

2.1 El estímulo reactivador no debe incluir la respuesta o el reforzador, causando una discrepancia entre lo obtenido y lo esperado.

2.2 La extensión temporal del estímulo reactivador debe inducir re-consolidación y no extinción (Pedreira, *et al.*, 2003).

2.3 Como el punto anterior implica que el animal computa un intervalo de tiempo entre el inicio del estímulo reactivador y su finalización, la presentación del estímulo reactivador debe detenerse por completo, si no, el estímulo reactivador no podrá inducir re-consolidación (Pedreira, *et al.*, 2004).

3.- El estímulo reactivador se presenta en el mismo contexto (Nader, 2009), esto es porque el contexto donde se realiza una tarea conductual es un indicador importante para esperar el estímulo incondicionado.

Existe evidencia a favor de otro parámetro de la re-consolidación. Esto es, cuando nueva información se incorpora al trazo de memoria ya consolidado para actualizarlo (Rodríguez Ortiz, *et al.*, 2005). La actualización del trazo de memoria requiere de síntesis de nuevas proteínas para consolidarse. Lo anterior implicaría que la re-consolidación subyace a la actualización de la memoria. La síntesis de nuevas proteínas que se presenta al reactivar el trazo de memoria ya consolidado, estabilizaría el trazo de memoria actualizado, permitiéndole al sistema incorporar información. Como más adelante veremos, los mecanismos moleculares difieren entre consolidación y re-consolidación.

3.3.2 Actualización del trazo de memoria

La actualización de la memoria fue descrita por primera vez en el protocolo conductual de atenuación de la neofobia (Rodríguez Ortiz *et al.*, 2005).

Este paradigma consiste en presentar un sabor novedoso a los animales, en este caso ratas winstar. Los animales en principio consumen en menor cantidad de este nuevo sabor. En el protocolo de neofobia se considera una respuesta neofóbica a la reducción de consumo en comparación con la línea base de un sabor seguro. Se realiza una curva de atenuación, es decir, la presentación consecutiva de un sabor novedoso hasta que se alcanza un punto máximo de consumo, siendo una presentación por día. En este punto, el consumo del animal se estabiliza en una asíntota de desempeño; éste es el criterio para llamarlo punto de consumo máximo. Cuando se alcanza este punto donde el consumo es máximo, se dice que se llegó a una *asíntota conductual*.

El sabor novedoso se aprendió como seguro después de que el animal experimentó que no había consecuencias nocivas asociadas a este sabor. En este estudio se consideró que después de la sexta presentación de sabor los animales alcanzaron la asíntota conductual (Figura 5a). Posteriormente, se inyectó anisomicina a las ratas a partir de la sexta presentación y hasta la octava y última presentación. Generalmente, la anisomicina tiene efectos amnésicos sobre la conducta ya adquirida; este grupo de investigación observó que no había el efecto amnésico de la inyección intracraneal de anisomicina en la corteza insular, (Figura 5a). Notaron que al inyectar LiCl intraperitoneal, después de presentar el sabor seguro y una vez lograda la asíntota conductual al grupo experimental, en la sexta presentación se indujo malestar gástrico. Esto hace que el animal aprenda sobre un cambio relevante donde antes existía una condición segura (Figura 5c).

La integración de LiCl a la presentación del sabor cambia la clasificación del trazo, de seguro a aversivo. Al inyectar anisomicina se nota que sólo cuando se presenta información relevante, el trazo de memoria es susceptible a los agentes amnésicos y se observó que el efecto amnésico se dio sobre la información nueva, impidiendo la consolidación de información sobre el asocio miento entre el malestar gástrico y el sabor (Figura 5d). Esto comprobó que la inyección de anisomicina evitó que se incorporara nueva información a un trazo de memoria existente (Figura 5d). Finalmente, se observó cómo el trazo de memoria que no está en los niveles de la asíntota conductual es susceptible a los efectos de la anisomicina (Figura 5b).

Con estos resultados se construyó la “Teoría de actualización de la memoria”, que propone la nueva ola de síntesis de proteínas como el medio para estabilizar la nueva información que se incorpora a un trazo de memoria existente. También se hizo notar que el trazo de memoria sólo es reactivado cuando se presenta información relevante. Es decir, el trazo de memoria es reactivado selectivamente, permitiendo incorporar nueva información. A partir de este punto es que nos preguntamos: ¿mediante qué mecanismo(s) el trazo de memoria es desestabilizado volviéndose vulnerable?

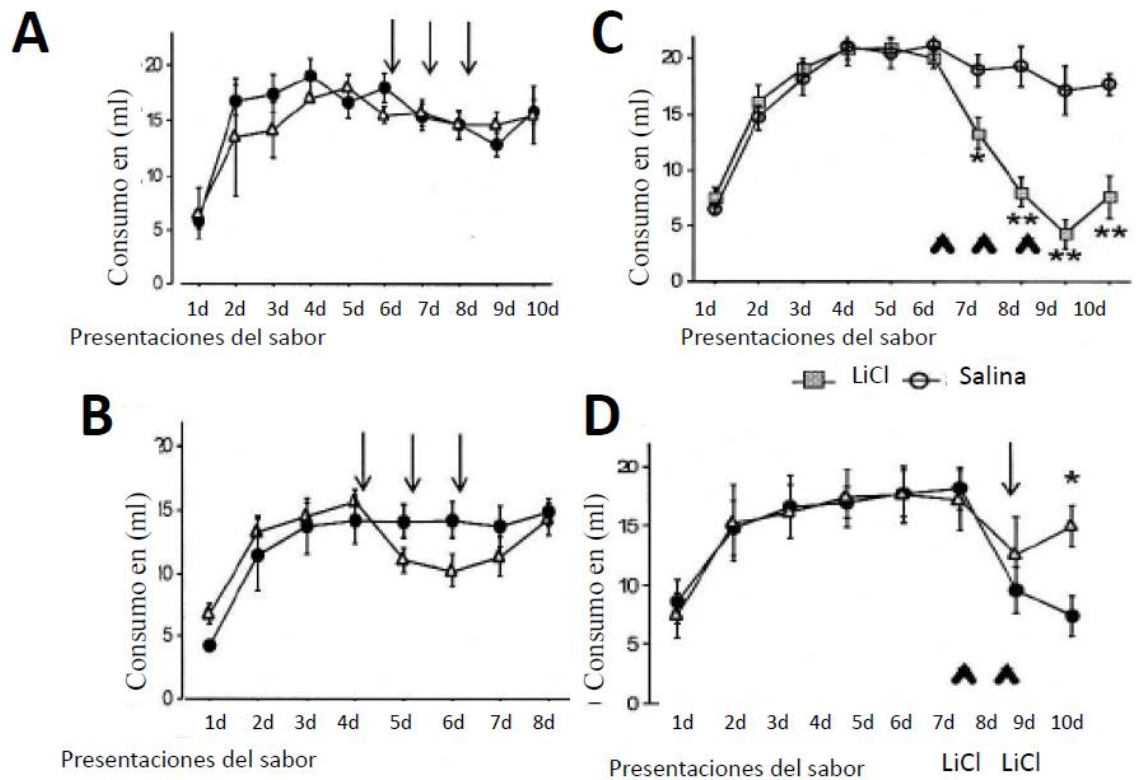


Figura 5. Las flechas indican el momento de la infusión de anisomicina, grupo control (círculos), grupo experimental (triángulos). La inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular no afecta la memoria de aversión ya consolidada, pero afecta el trazo de memoria de aversión cuando se incorpora nueva información, en una tarea de atenuación a la neofobia. En estas figuras se presentan los consumos en mililitros. En la Figura 5a observamos cómo la inyección de anisomicina en la corteza insular no afecta la memoria para los sabores a partir de la sexta presentación de sabor. En la Figura 5b se muestra como la inyección de anisomicina en la corteza insular afecta la memoria de sabores, cuando se inyecta en la cuarta presentación del sabor. Figura 5c se muestra como al inyectar i.p. un agente que induce malestar gástrico (LiCl), el volumen consumido del sabor asociado con malestar gástrico disminuye, efecto no visto cuando se inyecta solución salina. En la Figura 5d se muestra cómo la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular impide la actualización del trazo de memoria. (Modificada de Rodríguez-Ortiz, et al., 2005).

3.3.3 Mecanismos de desestabilización de la memoria

Existen reportes que han demostrado que la consolidación y la plasticidad sináptica dependen de la síntesis de nuevas proteínas (Nader, et al., 2000; Garcia-de la Torre, et al., 2009); no obstante, se ha demostrado que estos procesos también dependen de la

degradación de proteínas (Artinian, *et al.*, 2008; Lee, 2008; Lee S., *et al.*, 2008). Descrito por primera vez en la *Aplysia Californica* (Hegde, *et al.*, 1997), la degradación de proteínas por la vía del proteosoma ha demostrado ser un mecanismo necesario para la consolidación de la memoria (Lopez-Salon, *et al.*, 2001; Upadhya, *et al.*, 2004; Ashraf, *et al.*, 2006; Merlo, *et al.*, 2007; Artinian, *et al.*, 2008).

Una serie de estudios han evaluado la relación entre la acción del sistema ubiquitina proteosoma y el aprendizaje mostrado, y también es necesaria su participación para la extinción de la memoria (Kaang, *et al.*, 2009). Esto nos indicaría que es necesaria la degradación de proteínas por esta vía para agregar nueva información.

Sobre la re-consolidación de la memoria, otros estudios (Lee, 2008; Lee S., *et al.*, 2008) muestran que la inhibición de la degradación de proteínas evita la incorporación de nueva información (actualización) en el trazo de memoria. En estos trabajos se aporta evidencia a favor de que la degradación de proteínas es uno de los mecanismos que subyacen a la desestabilización del trazo de memoria reactivado; y sin esto, no es posible la actualización de la memoria (Lee, 2008a; Lee, *et al.*, 2008b).

Como se ha demostrado antes (Nader, *et al.*, 2000), la anisomicina tiene efectos amnésicos sobre un trazo de memoria ya consolidado previamente, sólo si éste es reactivado. Por ello, el hecho de que la inhibición del proteosoma proteja contra los efectos amnésicos de la anisomicina aporta más evidencia sobre la relación entre la degradación de proteínas y la desestabilización del trazo de memoria, hecho que se describe a continuación (Figura 6).

En un paradigma de condicionamiento contextual al miedo en ratas (Figura 7), Lee (2008a), observó el efecto de protección al trazo de memoria al inhibir la degradación de proteínas por el proteosoma, cuando el trazo de memoria es reactivado. Además de proteger contra la amnesia, la inhibición del proteosoma evita la actualización del trazo de memoria.

El procedimiento conductual usado por Lee (2008), consiste en una asociación entre un ambiente y un estímulo aversivo. El procedimiento consta en exponer a un animal en un ambiente novedoso y aplicarle un estímulo aversivo; normalmente es un choque eléctrico que no debe dañar el tejido de las patas (Curzon, *et al.*, 2009). Al volver a ser colocado en el mismo ambiente, el animal manifestará una reacción de congelamiento que se ha definido como la ausencia de movimiento, con excepción de la respiración (Curzon, *et al.*, 2009). Además, se mide el tiempo que muestra la conducta de congelamiento el animal.

Es importante hacer notar que al inyectar conjuntamente lactacistina y anisomicina, el efecto de lactacistina protege al trazo de memoria del efecto amnésico de la anisomicina, dejando intacta la información previamente consolidada (Lee, 2008), sugiriendo que es necesaria la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma para desestabilizar el trazo de memoria; sin la acción del sistema ubiquitina-proteosoma no se puede agregar nueva información, haciéndolo un componente vital para la consolidación y la re-consolidación de la memoria.

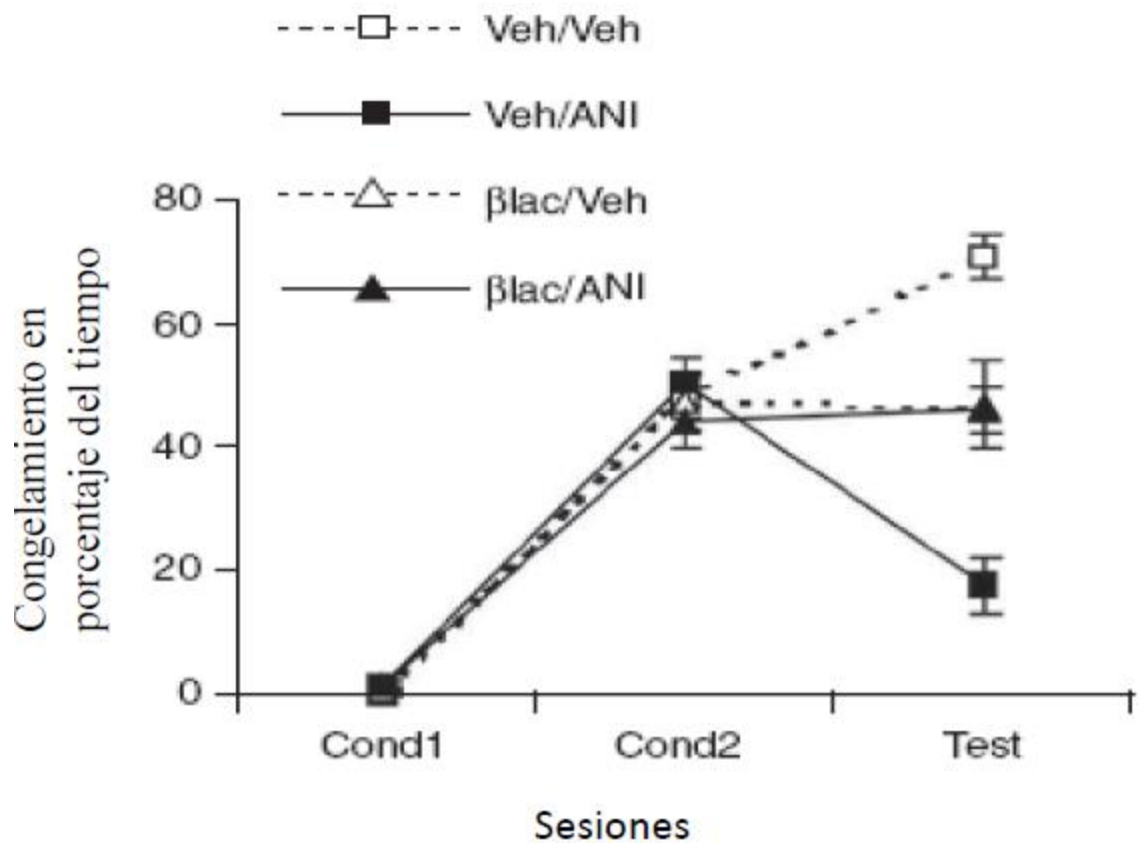
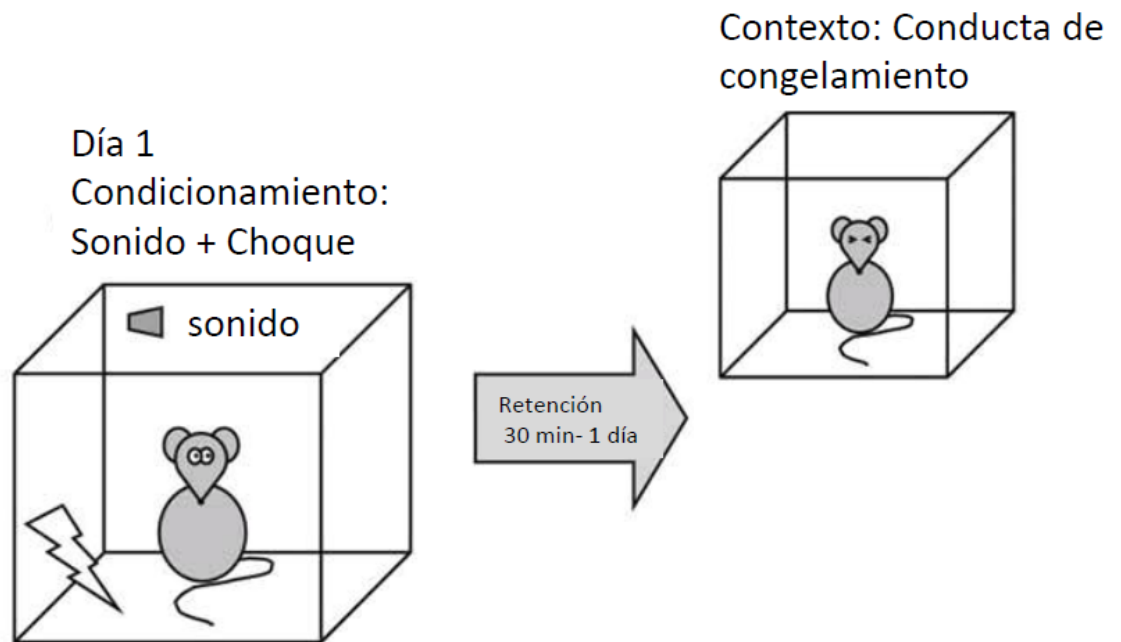


Figura 6. La inhibición del proteosoma protege al trazo de memoria de los efectos amnésicos de la anisomicina. En la gráfica se observan los resultados de un protocolo de condicionamiento al miedo. Fueron realizados 2 entrenamientos a razón de 1 por día y posteriormente, la prueba en el tercer día. En el eje de las ordenadas se reporta el porcentaje de congelamiento. La clasto Lactacistin β lactone (β lac) (fármaco que comparte el efecto de inhibir la actividad proteolítica del proteosoma con la lactacistina) protege, aunque no previene, el efecto amnésico causado por Anisomicina (ANI), inhibidor de síntesis de proteínas, este efecto contrasta cuando se inyecta anisomicina con solución vehiculo (Veh), (Modificada de Lee, 2008).



*Figura 7. Condicionamiento contextual al miedo. En este protocolo se introduce a un animal a un ambiente nuevo y se le aplica un choque eléctrico. Al exponerlo posteriormente al mismo ambiente el animal presenta conducta de congelamiento (Modificada de Rodríguez *et al.*, 2006).*

Con los resultados anteriores, donde se observa la participación del sistema ubiquitina proteosoma en los procesos de consolidación, re-consolidación y extinción de la memoria (Artinian, *et al.*, 2009; Lee, 2008; Kaang, *et al.*, 2009), muestran que la degradación de proteínas es necesaria para agregar información.

Kaang *et al.* (2009), han propuesto que la degradación de proteínas por la vía del proteosoma es con el fin último de reorganizar la estructura de la sinapsis. Esto podría brindar la oportunidad de actualizar el trazo de memoria, especialmente si las memorias ya no son válidas en el ambiente, permitiendo al organismo adaptarse (Kaang, *et al.*, 2009).

En este sentido (Lee, *et al.*, 2008b) mostraron que la inhibición del proteosoma impide la actualización de la memoria tras su reactivación. También reportan que la proteína estructural *shank* es degradada tras la reactivación de la memoria, por lo que podría ser una condición necesaria para la actualización de la misma.

Otra tarea conductual en donde se ha reportado que la inhibición del proteosoma evita la actualización de información es el “Laberinto acuático de Morris” (Artinian, *et al.*, 2008), que mide memoria espacial. El procedimiento consiste en entrenar animales para que encuentren una plataforma sumergida en un tanque con agua. La plataforma está a

escasos centímetros de la superficie del agua. La rata es colocada en diferentes posiciones dentro del tanque y tiene que aprender a localizar la plataforma escondida. El tanque se divide en cuadrantes. La prueba se realiza quitando la plataforma y colocando al animal desde las posiciones que fue entrenado, pero quitando la plataforma del tanque. Se mide el tiempo que tarda en llegar a la plataforma (latencia) y el número de cruces por el cuadrante donde estaba colocada la plataforma.

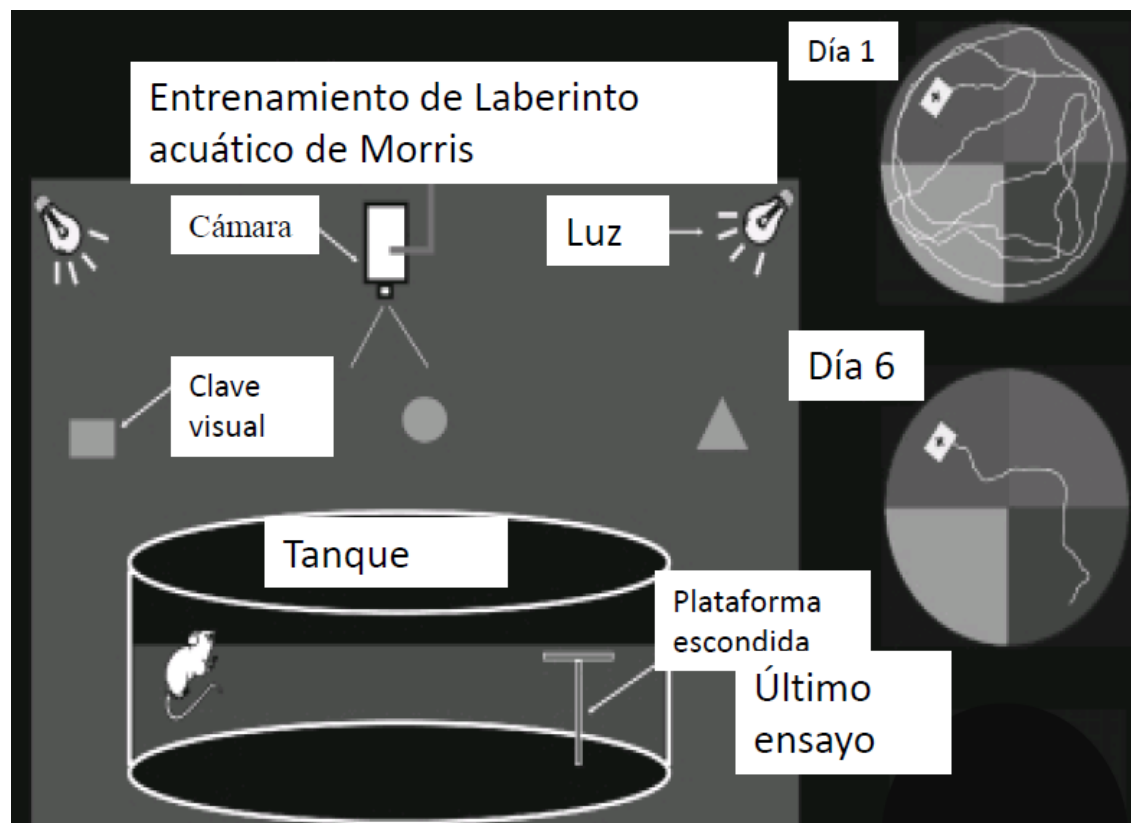


Figura 8. Laberinto acuático de Morris. A la derecha de la figura se muestra un esquema del desempeño prototípico en ésta tarea. En la parte izquierda se muestra el equipo y su acomodo en el espacio de éste protocolo (Modificada de Alvin, et al., 2009).

Es importante hacer notar la independencia entre la actividad del proteosoma y la memoria a corto plazo. La inhibición de la degradación de proteínas por el proteosoma deja intacta la memoria a corto plazo (Hegde *et al.*, 1997; Lopez-Salon *et al.*, 2001; Merlo, *et al.*, 2007; Artinian *et al.*, 2008). La memoria a corto plazo es independiente de los efectos de la lactacistina, fármaco que inhibe la acción catalítica del proteosoma y con el cual se busca investigar la relación entre el proceso cognitivo y el molecular, objeto de nuestro estudio. La memoria a corto plazo sirve como indicador de que el condicionamiento fue adecuadamente procesado y con ello se pueden descartar la

posible acción de lesión cerebral, ya sea por la cirugía o por el mismo fármaco. Además, se descarta la incorrecta aplicación del condicionamiento.

3.3.3.1 Degradación de proteínas por el sistema ubiquitina proteosoma (UPS) y estabilización de la memoria.

La proteólisis direccionada por la vía del sistema ubiquitina proteosoma juega un papel esencial en el control temporal y espacial de la expresión génica. La ubiquitina es una proteína de 76 residuos existente en todas las células eucariotas implicada en la degradación de proteínas. La degradación por la vía del UPS depende del enlace covalente entre la ubiquitina y los substratos blanco, generalmente un polipéptido, empero también puede ser ubiquitina o proteínas parecidas a la ubiquitina, porque la ubiquitina tiene varias lisinas, misma que puede ubiquitinarse formando cadenas de ubiquitina. Esta modificación desencadena una cascada enzimática que involucra a E1-E2-E3, que resulta en la unión covalente entre la ubiquitina y el grupo NH₂ de una lisina del sustrato y su transferencia al complejo proteolítico del proteosoma 26S, donde posteriormente se degradarán (Dauntuma, *et al.*, 2009) (Figura 9)

Las moléculas de ubiquitina son unidas a las proteínas blanco mediante una serie de enzimas: E1 que lleva a cabo la activación de la ubiquitina, E2 que realiza la conjugación y E3 que funciona como una ligasa. E3 es de principal importancia, ya que brinda al proceso especificidad, al unir la ubiquitina con el polipéptido blanco (Tuoc, *et al.*, 2010).

El sistema ubiquitina proteosoma puede hidrolizar casi cualquier polipéptido mediante la acción combinada de 3 diferentes proteasas –enzimas que rompen los enlaces peptídicos- que complementan su actividad entre sí. Estas proteasas tienen actividad de caspasas, tripsinas y quimiotripsinas y se encuentran en la cámara proteolítica del núcleo del proteosoma 20S (Dauntuma, *et al.*, 2009).

El proteosoma es entonces un complejo proteolítico macromolecular involucrado en la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina; su estructura tiene un cuerpo principal de forma cilíndrica compuesta de 20 subunidades de proteínas multicatalíticas y 2 subunidades en forma de semicírculo (Peters, *et al.*, 1993).

Su acción principal es la degradación de proteínas de corta duración y proteínas mal plegadas (proteínas que no lograron una configuración tridimensional adecuada) (Peters, *et al.*, 1993).

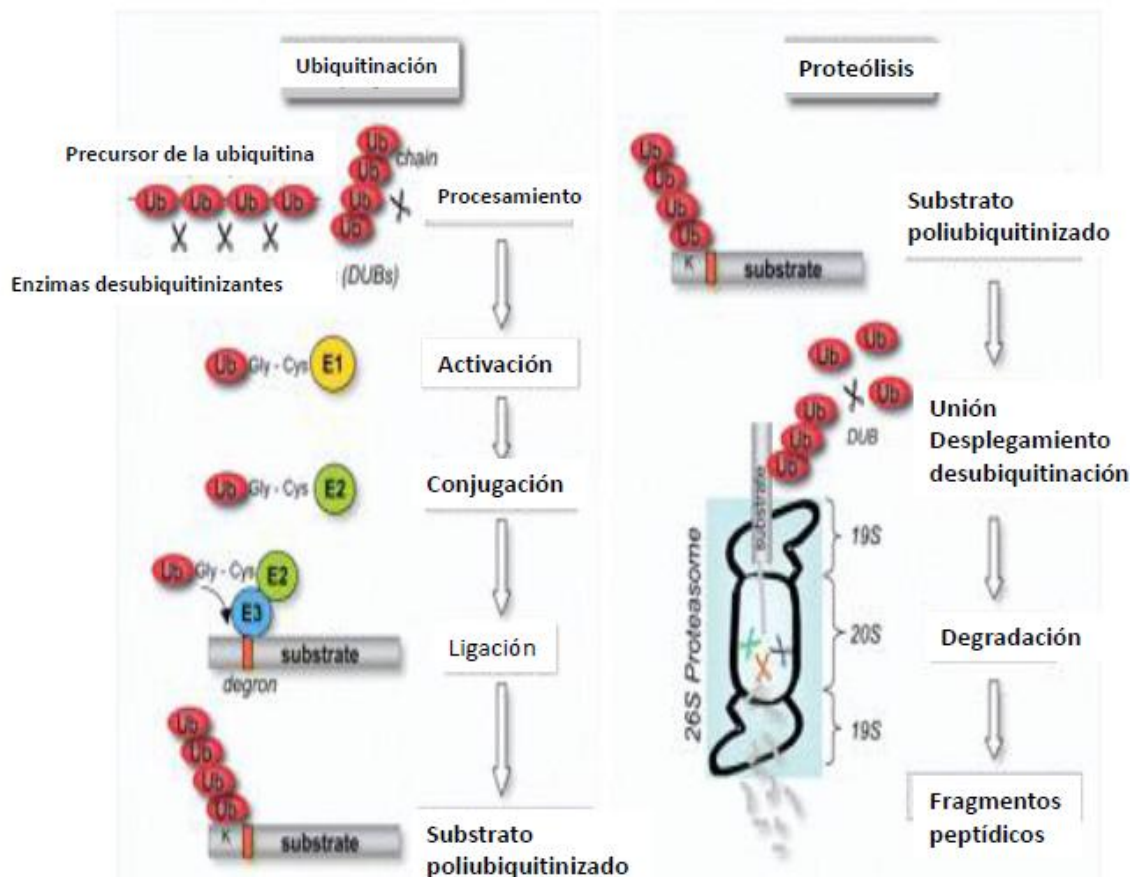


Figura 9. El sistema ubiquitina proteosoma. Ubiquitina libre es generada por el corte de ubiquitina de las cadenas de ubiquitina por las enzimas llamadas desubiquinizadoras (DUBs). Una cascada con tres enzimas E1, E2, y E3 forma cadenas de ubiquitina unida covalentemente en las proteínas blanco, que son seleccionadas por una cadena de aminoácidos que señala donde inicia la degradación (degron). El sustrato ubiquitinizado es reconocido por el proteosoma donde también ocurren despliegamiento y desubiquitinación antes de la hidrólisis en la cámara de la subunidad 20s. (Modificado de Dantuma 2009).

Con la información presentada anteriormente, se pretendió continuar con las investigaciones acerca de la relación de la actualización de un trazo de memoria y el sistema ubiquitina proteosoma (UPS). Con el fin de investigar si la memoria a largo plazo en una tarea de aversión a los sabores que requiere de la degradación proteica por el UPS, se entrenaron a ratas en esta tarea para posteriormente inyectar lactacistina en la corteza insular.

La lactacistina es un metabolito de la bacteria *Streptomyces*, descubierto en 1990 y tiene la propiedad de inhibir selectivamente el proteosoma y con este efecto, el sistema ubiquitina proteosoma involucrado en la degradación de proteínas. La lactacistina realiza su función debido a que se adhiere de forma irreversible a la subunidad catalítica 20S, en su treonina terminal inhibiendo la actividad de quimotripsinas y tripsinas, enzimas con acción catalítica (hoja técnica de Tocris). Debido a su efecto de inhibir el

proteosoma, es usada en todo tipo de experimentos en bioquímica. En el campo de la neurobiología se le ha usado en estudios sobre memoria (Artinian, *et al.*, 2008; Lee, 2008a; Lee, *et al.*, 2008b), ya que se cree que el UPS está involucrado en el proceso de desestabilización del trazo de memoria.

IV Planteamiento del problema, hipótesis, objetivos y justificación

4.1 Planteamiento del problema

La degradación de proteínas por el proteosoma es necesaria para la consolidación y la actualización de la memoria. Para algunos modelos se ha reportado su participación en la consolidación y actualización de la memoria.

Sin embargo, no se ha estudiado el papel del sistema ubiquitina proteosoma en el condicionamiento de aversión a sabores. Por los antecedentes presentados, resulta factible pensar que el sistema ubiquitina proteosoma es necesario para almacenar nueva información del CAS y que tenga lugar en la corteza insular.

4.2 Pregunta de investigación

¿Para la actualización de la memoria de aversión a los sabores es necesaria la degradación de proteínas por el UPS en la corteza insular?

4.3 Hipótesis

La incorporación de nueva información derivada de la experiencia requiere de la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteosoma.

4.4 Objetivo general

Determinar si la degradación de proteínas en la corteza insular es necesaria para la consolidación y actualización en el CAS.

4.5 Objetivos específicos

- 1.- Determinar si la degradación de proteínas por el proteosoma en la corteza insular es necesaria para la consolidación de la memoria de aversión a los sabores.
- 2.- Determinar si la degradación de proteínas por el proteosoma en la corteza insular es necesaria para la incorporación de nueva información al trazo de memoria de aversión a los sabores.
- 3.- Determinar si el efecto de la inhibición de la degradación de proteínas en la corteza insular es específico de la memoria de aversión a los sabores de largo plazo.

V MÉTODO

5.1 Sujetos

Se usaron ratas Wistar macho de la cepa del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, de entre 250 y 300 gramos de peso al momento del experimento. Las ratas estuvieron en ciclo de luz oscuridad 12h/12h (señala a qué hora es el cambio de luz); se alojaron en cajas de acrílico individuales con acceso *ad libitum* a comida y agua, salvo al momento de la manipulación experimental. Las manipulaciones, así como los procedimientos experimentales se hicieron en el ciclo de luz. En todos los experimentos se siguió con los estándares de trato ético a los animales.

5.2 Cirugía esterotáxica de implantación de cánulas en la corteza insular

Los sujetos fueron anestesiados con Ketamina (0.225ml/Kg) y Xilazina (0.1ml/Kg) vía intraperitoneal. La cirugía consiste en colocar cánulas de acero de 12mm y 23 Ga fijadas al cráneo del animal con cemento dental y tornillos colocados en el cráneo.

Las coordenadas de las estructuras se obtuvieron del atlas anatómico de Paxinos & Watson (1986); para la corteza insular (mm): anterior 1.2, lateral +/-5.5, ventral -4. Las cánulas se pusieron 2 mm arriba de la zona de interés para evitar lesiones. Se usó penicilina procaínica para evitar infecciones y las ratas estuvieron una semana en recuperación después de la cirugía.

5.3 Procedimiento conductual de CAS

Para todos los experimentos se realizaron 2 grupos. Uno experimental al que se le inyectó lactacistina 20 minutos antes entrenamiento de CAS. Al grupo control se le inyectó solución vehículo, también 20 minutos antes del entrenamiento.

Se privó de agua por un día; se realizó una línea base de consumos de agua por 3 días y al cuarto día se realizó el entrenamiento de CAS. En algunos experimentos se realizó otro ensayo de CAS en el quinto día, para reactivar el trazo de memoria. La prueba se realizó 24 horas después (largo plazo) o cinco horas después (corto plazo).

5.4 Inyección de LiCl i.p. y medición de volumen consumido.

Una solución 0.15M de LiCl (10mL/Kg) se inyectó intraperitonealmente (i.p.), ya que a esta concentración de LiCl ha probado ser efectiva para producir CAS (García de la Torre *et al.*, 2009).

Los consumos de sacarina se midieron con probetas graduadas con 0.5 mililitros de precisión; estas llevan un tapón de hule con el bebedero en medio del tapón. Los consumos se registraron y los resultados se graficaron en porcentaje promedio de consumo de la línea base o del primer CAS.

5.5 Experimentos

5.5.1 Procedimientos generales:

Línea base: consistió en medir el consumo de agua de las ratas por 15 minutos una vez al día, por tres días.

CAS: consumo de sacarina (sacarina 0.1% por 15 minutos) seguido de inyección de LiCl intraperitoneal (i.p.) 15 min después del consumo de sacarina.

Micro inyección: se inyecta solución vehículo (veh) o lactacistina (lac) intracraneal en la corteza insular, 20 minutos antes de la adquisición.

Prueba: consiste en presentar sacarina por 15 minutos y cuantificar el volumen consumido.

5.5.2 Experimento 1

En el experimento las ratas fueron canuladas en la corteza insular, después se estableció una línea basal de consumos. Al cuarto día se realizó el protocolo de CAS siendo ésta la primera adquisición del CAS. Al día siguiente, se inyectó lac o veh 20 minutos antes de la segunda adquisición; 24 horas después se realizó la prueba *LTM*.

Inyección lac/veh



Figura 10. Diagrama del experimento 1. Se inició con el establecimiento de una línea base. Al cuarto día se realizó el primer entrenamiento de CAS. Al quinto día se realizó la inyección intracraneal de lac o veh antes del segundo entrenamiento de CAS; 24 horas después se realizó la prueba de LTM. Prueba de memoria a largo plazo (LTM), condicionamiento de aversión al sabor (CAS), lactacitina (lac) y vehículo (veh).

5.5.3 Experimento 2

En el experimento las ratas fueron canuladas en la corteza insular y después se realizó el protocolo de CAS. Al día siguiente se micro inyectó veh o lac en la corteza insular y 20 minutos después se llevó a cabo el segundo entrenamiento de CAS. Cinco horas después se realizó la prueba de corto plazo (*STM*).

Inyección lac/veh



Figura 11. Diagrama del experimento 2. Se inició con el establecimiento de una línea base. Al cuarto día se realizó el primer entrenamiento de CAS. Al quinto

día se realizó la inyección intracraneal de lac o veh 20 minutos antes del segundo entrenamiento de CAS, cinco horas después se realizó la prueba STM. Prueba de memoria a corto plazo (STM), condicionamiento de aversión al sabor (CAS), lactacitina (lac) y vehículo (veh)

5.5.4 Experimento 3

En este experimento se realizó una línea base, se inyectó lac o veh en la corteza insular 20 minutos antes de la primera adquisición del CAS.

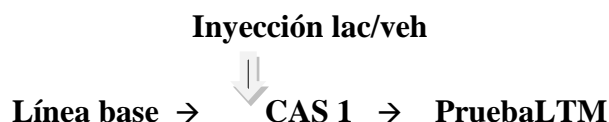


Figura 12. Diagrama del experimento 3. Línea base. En el cuarto día se realizó la inyección intracraneal de lac o veh 20 minutos antes del entrenamiento de CAS. 24 horas después del entrenamiento de CAS, se realizó la prueba de LTM. Prueba de memoria a largo plazo (LTM), condicionamiento de aversión al sabor (CAS), lactacitina (lac) y vehículo (veh)

5.5.5 Experimento 4

Hicimos este experimento para descartar que la falta de efecto en la primera adquisición se debiera a que la concentración de lac fuera insuficiente. En este experimento se realizó una línea base, se inyectó lac (1 μ M) o veh en la corteza insular 20 minutos antes de la primera adquisición del CAS.

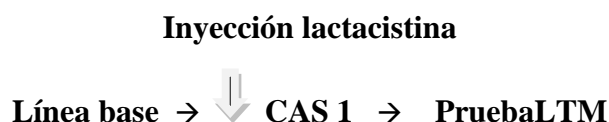


Figura 13. Diagrama del experimento 4. Establecimiento de la línea base, al cuarto día se realizó la inyección de lac (1 μ M) o veh 20 minutos antes del entrenamiento de CAS. 24 horas después se realizó la prueba de LTM. Prueba de memoria a largo plazo (LTM), condicionamiento de aversión al sabor (CAS), lactacitina (lac) y vehículo (veh)

5.6 Microinyección

Se inyectó lac mediante las cánulas, con jeringas marca Hamilton de 25 μ L a tasa de un μ L/min en cada hemisferio, la cual se controló con una bomba de microinyección automática. Se inyectó 20 minutos antes del primer ensayo de CAS para el primer experimento y en el segundo entrenamiento de CAS para el segundo experimento. El inyector atravesó la cánula y la punta llegó 2mm por debajo de la cánula para alcanzar

la zona de interés y se mantuvo ahí por un minuto después de la inyección para asegurar la difusión del fármaco. Para evitar complicaciones debido al estrés del procedimiento, se manipularon los animales por lo menos por 3 días antes de la inyección por 1 minuto.

5.7 Fármacos

Se usó el fármaco Lactacistina (Tocris) para los experimentos 1, 2 y 3 en una concentración 200 μ M disuelto en DMSO al 2% en solución salina.

Para el experimento cuatro se usó con una concentración 1 mM disuelto en DMSO al 2% en solución salina.

5.8 Pruebas estadísticas

Se realizó análisis de varianza mixto para hacer comparaciones entre los consumos del grupo experimental y el control. Este análisis estadístico compara las medias de dos o más grupos, en diferentes tiempos y nos arroja el valor F, que es el valor obtenido de dividir la varianza intergrupala entre la varianza intragrupal. Usamos la corrección de Bonferroni como *post hoc*, para corregir las comparaciones múltiples. Se consideraron significativos los resultados con un valor de $p < 0.05$, por ser el valor usado por convención en el campo. Los datos fueron analizados con el paquete estadístico Statview.

5.9 Histologías

Se realizaron histologías para comprobar el lugar donde se colocó la cánula como se describe en el punto 6.5

VI Resultados

6.1 Experimento 1

Efecto de la inhibición del proteosoma por lactacistina en el segundo entrenamiento de CAS, en la corteza insular.

Realizamos este experimento para evaluar si la degradación de proteínas es necesaria para la re-consolidación del CAS. Como se muestra en la figura 14, hubo una diferencia entre los ensayos $F(2, 27) = 54.01$; $p < 0.0001$, indicando que hubo una reducción significativa en el consumo del sabor debido a la aversión. Asimismo, hubo una diferencia entre grupos $F(1, 27) = 6.49$; $p = 0.02$, y la comparación por prueba t corregida para comparaciones múltiples por la prueba de Bonferroni nos indica que fueron diferentes al momento de la prueba, $t = 4.13$; $p < 0.001$. No hubo diferencias entre los grupos al momento de CAS1 ni al momento de CAS2.

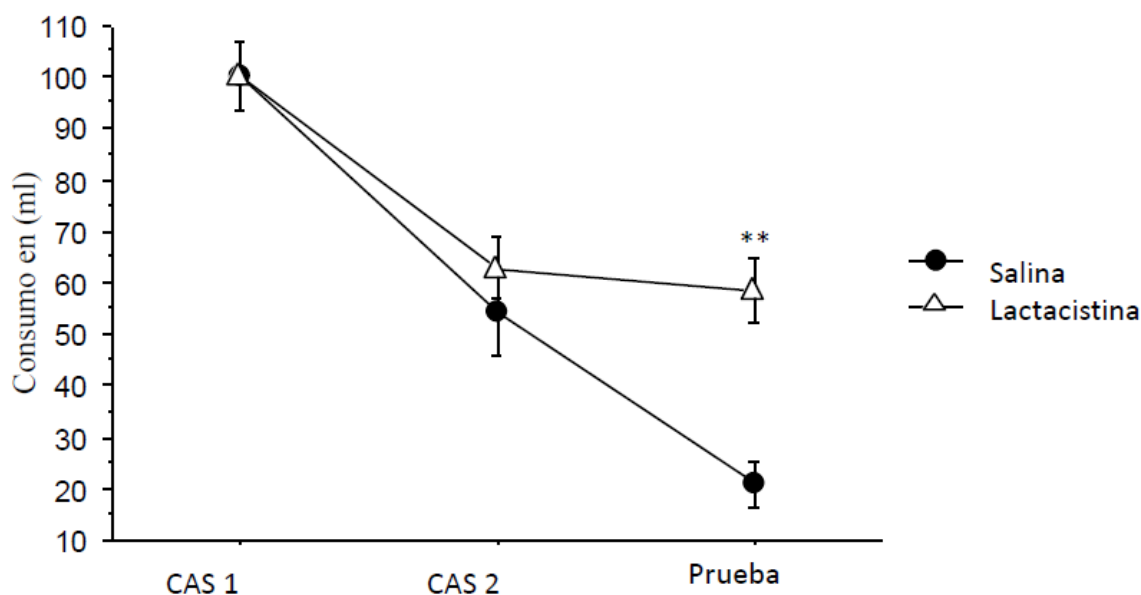


Figura 14. Inhibición del proteosoma por lactacistina. En esta figura se muestra el consumo de sacarina en porcentaje de la media del consumo grupal de agua. Inyección de lactacistina (triángulos) $n=13$ o solución vehículo (círculos) $n=16$ en la corteza insular. $**=0.02$ entre el grupo lactacistina y salina. Los resultados se muestran en \pm error estándar

6.2 Experimento 2

El efecto de la lactacistina es específico para la memoria de largo plazo

Diseñamos este experimento para evaluar los efectos de la lactacistina sobre la memoria a corto plazo. Como se muestra en la figura 15, se detectaron diferencias significativas entre los días $F(2,14)=95.49$; $p=0.0001$, lo que quiere decir que hubo una reducción en el consumo debido a la aversión al sabor. En este caso no hubo diferencias entre grupos $F(1,14)=0.05$; $p=0.83$, tampoco hubo interacción $F(2,14)=0.03$; $p=0.97$. No se detectaron diferencias entre grupos en CAS1 ni en CAS2 ni en la prueba.

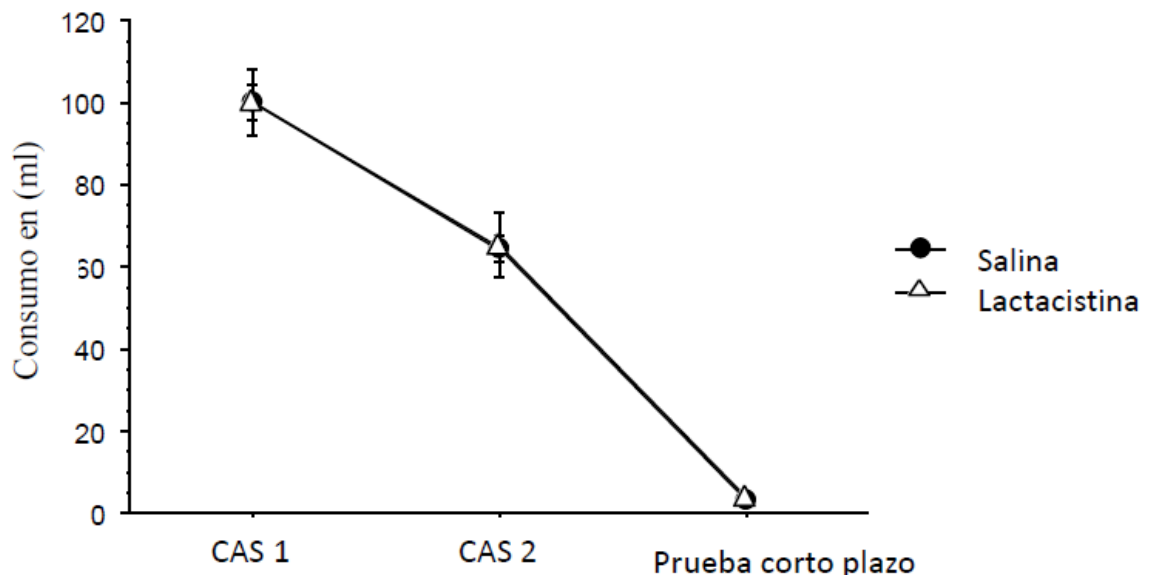


Figura 15. Efecto de la inhibición del proteosoma en la memoria a corto plazo. En esta figura se muestran el consumo de sacarina en porcentaje de la media del consumo grupal de agua. Inyección de lactacistina (triángulos) $n=8$ o solución vehículo (círculos) $n=8$ en la corteza insular. Los resultados se muestran en \pm error estándar

6.3 Experimento 3

El efecto de la lactacistina en la corteza insular en la memoria de aversión depende de que exista una memoria previa.

Se ha reportado con anterioridad la participación del sistema ubiquitina proteosoma en la consolidación de una tarea conductual presentada por primera vez (Lee, 2008b; Artinian, *et al.*, 2008). Para abordar este punto se diseñó el siguiente experimento.

En la figura 16 observamos que hubieron diferencias entre días $F(1,47)=31.23$; $p=0.0001$, indicando que hubo una reducción significativa en el volumen consumido debido a la aversión.

En éste caso no se detectaron diferencias entre grupos $F(1,47)=0.19$; $p=0.67$, tampoco hubo interacción $F(1,47)=0.18$; $p=0.68$. Los grupos no son diferentes ni en CAS1 ni en la prueba. La inyección de lactacistina en la corteza insular, no tuvo efecto sobre la consolidación del CAS

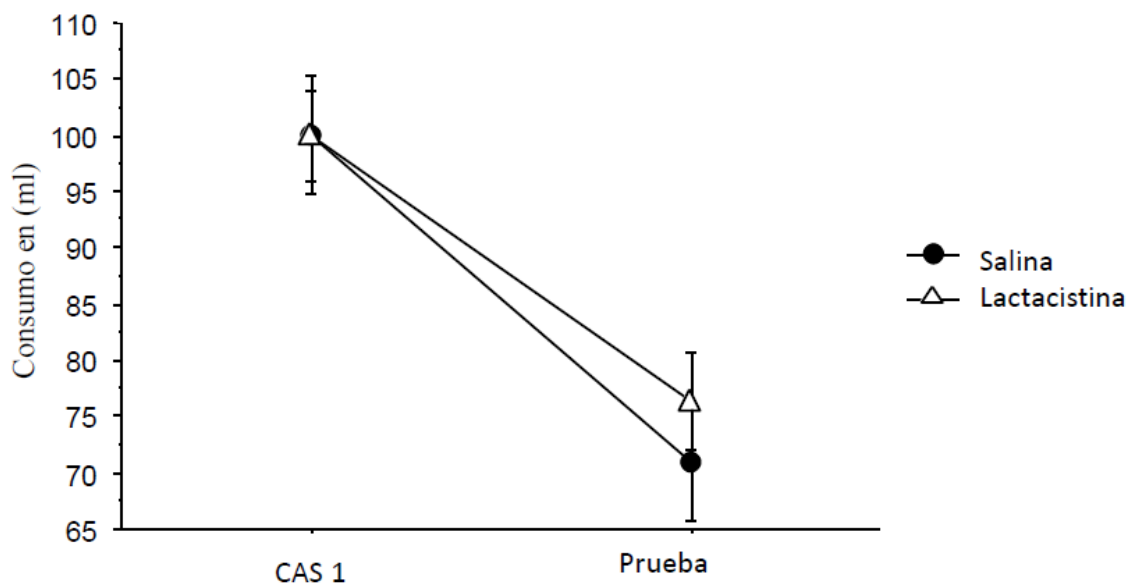


Figura 16. Inhibición del proteosoma por lactacistina en el primer entrenamiento. En esta figura se muestran el consumo de sacarina en porcentaje de la media del consumo grupal de agua. Inyección de lactacistina (triángulos) $n=27$ o solución vehículo (círculos) $n=23$ en la corteza insular. Los resultados se muestran en \pm error estándar

6.4 Experimento 4

Para descartar un posible efecto de la concentración de lactacistina usada sea insuficiente para producir un efecto sobre la consolidación del entrenamiento de CAS y sea ésta la razón de que no observemos efecto como en el experimento tres, inyectamos una concentración mayor de lactacistina (1 mM).

En la figura 17 observamos que hubieron diferencias entre días $F(1,13)=13.28$; $p=0.003$. En este caso no se detectaron diferencias entre grupos $F(1,13)=0.61$; $p=0.48$, tampoco hubo interacción $F(1,13)=0.33$; $p=0.57$.

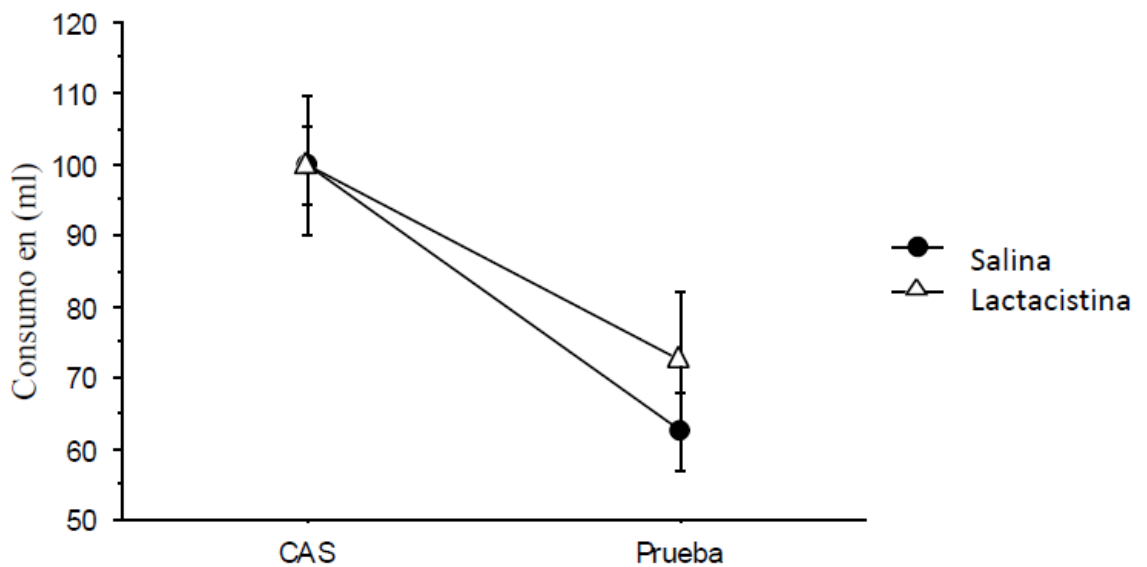


Figura 17. Efecto de una concentración mayor de lactacistina inyectada en el primer entrenamiento de CAS. En esta figura se muestran el consumo de sacarina en porcentaje de la media del consumo grupal de agua. Inyección de lactacistina (triángulos) $n=7$ o solución vehículo (círculos) $n=7$ en la corteza insular. Los resultados se muestran en \pm error estándar

6.5 Histología

Para corroborar los procedimientos quirúrgicos y saber si las cánulas fueron implantadas correctamente en la estructura deseada se realizó un análisis histológico. Al terminar los procedimientos conductuales, se les inyectó una sobredosis de pentobarbital sódico a las ratas, seguido de perfusión vía aórtica con solución salina 0.9%. Se extrajeron los cerebros y se colocaron en formaldehído 4% para fijar el tejido. Después se colocaron en diferentes concentraciones de solución de sacarosa 10, 20 y 30% hasta que caían al fondo del recipiente para cada concentración. Después se hicieron cortes de 40 micras, se tiñeron con violeta de cresilo y se analizaron bajo el microscopio. Sólo los datos de las ratas que fueron correctamente canulados en la IC fueron tomados en cuenta, para el análisis de resultados.

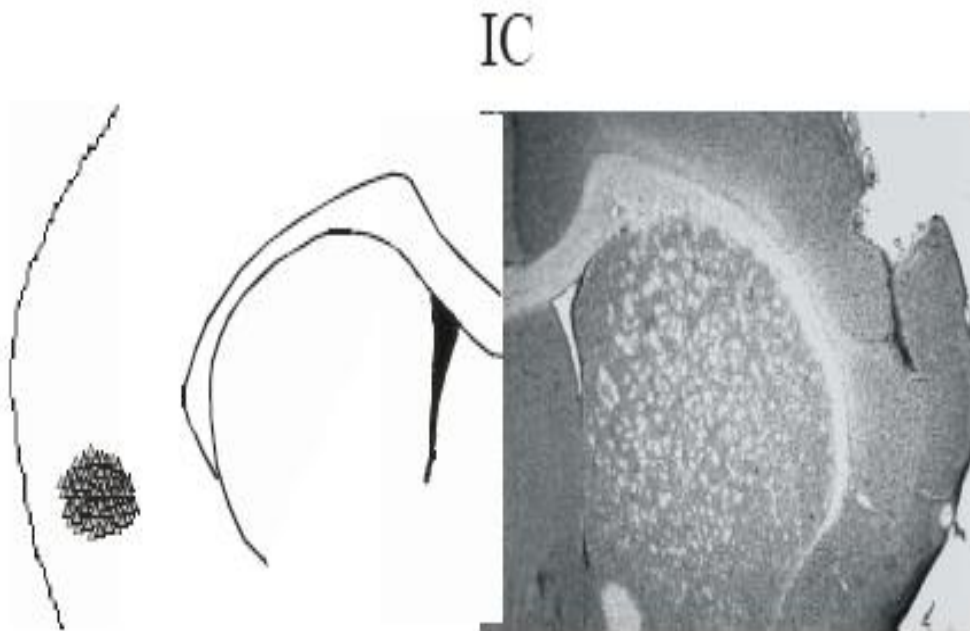


Figura 18. Corteza insular. Corte coronal de cerebro de rata. En la izquierda se muestra el diagrama de la zona donde cayeron los inyectores (triángulos). A la derecha se muestra una fotografía de uno de los cortes.

VII Discusión

7.1 La inhibición del sistema ubiquitina proteosoma en la corteza insular afecta la re-consolidación del CAS, pero no la consolidación del CAS.

Se ha reportado en otras tareas de aprendizaje que la degradación de proteínas es necesaria para la consolidación de la memoria (Lee, 2008; Lee, *et al.*, 2008b; Artinian, *et al.*, 2008) y para la re-consolidación (Artinian, *et al.*, 2008; Lee, 2008). En nuestros experimentos aportamos evidencia a favor de la teoría de la participación del proteosoma en la re-consolidación de la memoria, dado que los resultados apoyan la hipótesis de que es necesaria la degradación de proteínas por el proteosoma en la corteza insular, para que se actualice la memoria de aversión a sabores.

Sin embargo, no conseguimos efectos sobre la consolidación del CAS como vimos en los experimentos tres y cuatro. Los datos del experimento tres tomados en conjunto con los del experimento cuatro, sugieren que la inhibición de la degradación de proteínas en la corteza insular es insuficiente para impedir la consolidación del CAS.

Al inyectar en la corteza insular en el primer entrenamiento de CAS, esperábamos encontrar efectos sobre la consolidación del mismo, ya que como se mencionó en el marco teórico, estudios anteriores la señalan como la estructura donde se integran la información de ambos estímulos (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Esto se puede deber a que para afectar la consolidación del CAS, no basta con inhibir los procesos de la memoria a largo plazo en la corteza insular, como se ha visto en el trabajo de García de la Torre, *et al.*, (2009). En ese trabajo para lograr los efectos amnésicos sobre la consolidación del CAS por inhibición de la síntesis de proteínas, es necesario inhibir la síntesis de proteínas en la corteza insular y la amígdala central. Otro resultado de esta investigación muestra que, la infusión de anisomicina en la corteza insular o en la amígdala central afecta la incorporación del segundo entrenamiento de CAS, cuando se inyecta una hora antes de éste entrenamiento.

Con los resultados del estudio anterior, donde se muestra que para afectar la consolidación del CAS, se debe inyectar anisomicina en la corteza insular y la amígdala central, considero que es la causa de que observemos efecto en la re-consolidación y no en la consolidación. Por ello considero que la inyección de lactacistina en la corteza insular es insuficiente para afectar la consolidación del CAS. Tiempo después, nuestro grupo de investigación realizó la inyección conjunta de lactacistina intracraneal en la amígdala y la corteza insular observando efectos sobre la consolidación del CAS (Rodríguez-Ortiz, *et al.*, 2011).

La evidencia presentada en los párrafos anteriores de ésta sección, sugiere que el procesamiento de la información es diferente si se almacena información por primera vez, que si se agrega información a un trazo ya existente.

En el caso de almacenar información por primera vez, no es suficiente la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma en la corteza insular para afectar la consolidación del CAS.

Con el tiempo, se acumula más información a favor de tomar a los procesos de consolidación y re-consolidación como similares más no iguales, concretamente, al describir la re-consolidación como una recapitulación de la consolidación. Aunque son procesos que comparten mecanismos moleculares, la re-consolidación es diferente a la adición de información por primera vez.

En el trabajo de Berman, *et al.*, (2001) demostraron que la re-consolidación y la consolidación del CAS necesitan de diferentes eventos moleculares, esto mediante fármacos que bloquean la acción de los receptores NMDA, muscarínicos y beta adrenérgicos, la acción de MAPK y la síntesis de proteínas, observando efecto de todos ellos en la consolidación del CAS, mientras que para la re-consolidación del CAS es necesario sólo la síntesis de proteínas y los receptores beta adrenérgicos, aunado a otros estudios (Artinian, *et al.*, 2008) donde describen que la consolidación requiere de al menos de 2 eventos de síntesis de proteínas. La primera, inmediatamente después de la presentación de la conducta y la segunda, 4 horas después de la presentación de la conducta, mientras que para la re-consolidación sólo se ha descrito síntesis de proteínas inmediatamente después de la conducta.

Los datos provenientes de los estudios presentados en este apartado de las discusiones sugieren que los eventos moleculares de la consolidación perduran por más tiempo en comparación con los de la re-consolidación.

La razón por la cual se puede consolidar el CAS a pesar de la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma en la corteza insular, puede ser que la actividad reverberante del grupo de neuronas que procesa el CAS persista el tiempo suficiente, como para darle el tiempo necesario a la corteza insular de librarse de los efectos de la lactacistina y llevar a término la consolidación del CAS. También podría ser porque otras estructuras están consolidando el CAS.

7.2 El efecto de la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma en la corteza insular es específico para la memoria de largo plazo

En el experimento dos mostramos que no hay efecto sobre la memoria a corto plazo por la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma. Algunos trabajos han mostrado la especificidad de la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina proteosoma para la consolidación y re-consolidación de la memoria (Artinian, *et al.*, 2008; Lee, 2008). Por lo cual, no esperábamos que la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma tuviera efecto sobre la memoria a corto plazo. Existe más evidencia y no solamente en estudios, donde se inhibe el sistema ubiquitina proteosoma de la independencia de procesamiento entre la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo. En otros estudios, se ha logrado afectar la memoria a largo plazo y no la memoria a corto plazo (Izquierdo, *et al.*, 1998 a, b, c). Esto nos da evidencia de que la memoria a corto plazo no es requisito indispensable del almacenamiento de la memoria a largo plazo.

Otros estudios (Emptage, *et al.*, 1993), demuestran que se puede inducir facilitación a largo plazo sin inducir facilitación a corto plazo, sugiriendo que el procesamiento de la memoria a corto plazo es independiente de la memoria a largo plazo. Estos resultados

aunados a otros estudios (Shallice *et al.*, 1970; McCarthy, *et al.*, 1990 citados en Dudai, 2002; Izquierdo, *et al.*, 1998 a, b, c), donde afectan la memoria a corto plazo pero dejan intacta la memoria a largo plazo, sugieren que el procesamiento sea en paralelo.

Algunas posibles explicaciones que se han propuesto anteriormente en la literatura para dar cuenta de la independencia entre la memoria a corto plazo y a largo plazo son:

- 1.- La división entre memoria a corto plazo y largo plazo permite al organismo hacer uso de información para alguna tarea *ad hoc* pero irrelevante a largo plazo (Dudai, 2002).
- 2.- La etapa transitoria de la memoria a corto plazo permite al sistema organizar y seleccionar mejor la información antes de almacenarla a largo plazo (McClelland citado en Dudai, 2002).
- 3.- Existen las fases de largo plazo y corto plazo en la memoria, porque es la única forma que la memoria biológica es capaz de funcionar, debido a las restricciones funcionales y estructurales de la maquinaria biológica (Dudai, 2002).

Tomando como punto de partida que las propiedades físicas del sistema imponen restricciones a las posibles formas de procesamiento del sistema, se cree que la memoria es procesada por un circuito neuronal y se almacena en forma de un patrón de activación determinado por ese circuito neuronal (Dudai, 2002). Esto implica que la memoria es reconstruida, lo que persiste son los cambios que el sistema llevó a cabo para reconstruir este patrón de activación de una determinada forma (Dudai, 2002).

Por lo cual no resulta aventurado suponer que si la memoria es procesada por una red de neuronas, también comparta características con otros procesos que son procesados en conjuntos de unidades interconectadas. Un ejemplo de esto proviene de los modelos conexionistas (Plunkett, 1997). Estos modelos ofrecen información sobre principios generales de la organización funcional de las neuronas (Randall, *et al.*, 2005) y han logrado simular procesos como el aprendizaje de algunos aspectos del lenguaje (Plunkett, 1997), mientras que en el campo de la memoria pueden dar cuenta de las capacidades de aprendizaje afectadas o preservadas con lesiones del hipocampo en el condicionamiento, la habituación, el aprendizaje contextual, la memoria de reconocimiento y amnesia retrógrada (Randall, *et al.*, 2005), por mencionar algunos ejemplos. En los modelos con enfoque conexionista toman como punto de partida las propiedades de procesamiento del sistema nervioso para hacer sus modelos, en los cuales observamos un conjunto interconectado de unidades de procesamiento. Las unidades se pueden ver como neuronas y las conexiones como sinapsis. En éstos modelos el procesamiento está distribuido en la red (Randall, *et al.*, 2005).

7.3 El proceso de re-consolidación como medio para actualizar la memoria

Se ha reportado anteriormente que el trazo de memoria al ser reactivado se desestabiliza (Nader, *et al.*, 2000). En éste trabajo aportamos evidencia sobre la hipótesis de que el proceso de desestabilización del trazo de memoria, cuando este es reactivado, tiene como fin agregar información novedosa a un trazo de memoria existente (Rodríguez-Ortiz, *et al.*, 2005).

En nuestro experimento uno, el consumo de sacarina del grupo experimental del primer ensayo de CAS no difiere del consumo de sacarina del segundo ensayo de CAS, del mismo grupo. Por lo cual, inferimos que existe efecto sobre la incorporación de información del segundo entrenamiento de CAS, al inhibir el proteosoma en la corteza insular. Con nuestro protocolo, podemos observar que no se agrega información al trazo existente cuando se inhibe el sistema ubiquitina proteosoma en la corteza insular. Lo anterior indica que es necesaria la desestabilización del trazo de memoria para agregar información y uno de los mecanismos que subyace a la desestabilización del trazo de memoria es la degradación de proteínas por el sistema ubiquitina proteosoma. Esto es congruente con otros estudios donde la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma evita la incorporación de nueva información (Lee, 2008).

7.4 Reactivación de la memoria y desestabilización del trazo de memoria

Al igual que nosotros, en el estudio de Artinian *et al.*, (2008), usan un ensayo de adquisición como estímulo reactivador de la memoria y observan efecto en consolidación y re-consolidación de la memoria. Las diferencias entre sus resultados y los nuestros, con respecto a los efectos de la inhibición del sistema ubiquitina proteosoma en la consolidación, puede que se deban a que ellos usan laberinto acuático y la estructura donde inhiben el sistema ubiquitina proteosoma, el hipocampo, es suficiente para observar algún efecto.

Aunque se ha reportado otros estudios (Cammarota, *et al.*, 2004), que no se puede inducir reactivación con otro ensayo de adquisición, considero que esta interpretación de los resultados se debe a que por el proceso de consolidación de sistemas, las estructuras que procesan y consolidan información derivada de un determinado protocolo conductual, pueden no ser las mismas que procesan la actualización del trazo de memoria, como en el caso de la inhibición pasiva, protocolo usado por estos investigadores (Cammarota, *et al.*, 2004). El mismo grupo de trabajo logra tener efectos sobre la re-consolidación de la inhibición pasiva, cuando inhiben la síntesis de proteínas en el estriado (Cammarota, *et al.*, 2005).

Con lo anterior, se mantiene como el mejor criterio para reactivar el trazo de memoria el usar otro ensayo de adquisición como estímulo reactivador. Estudios como el de Donald Lewis *et. al.*, (citado en Sara, 2000) también apuntan a que son las claves involucradas en la tarea conductual y no otros factores como los estados emocionales o de motivación lo que dispara la reactivación del trazo de memoria.

VIII Limitaciones y sugerencias

Este proyecto no alcanza a responder qué proteínas son las que se degradan al momento de la consolidación y/o al momento de la re-consolidación. Es importante trabajar en esto porque aportaría información para entender a mayor detalle cómo es la relación entre el remodelamiento sináptico y la memoria. Se sugiere que se analicen cómo se regula la expresión de proteínas durante los eventos de consolidación, re-consolidación y de persistencia de la memoria. Así podríamos inferir, a partir de la función ya reportada de las proteínas que participan en estos procesos, los requerimientos del sistema para lograr almacenar a largo plazo la información. Un experimento que propongo es observar si la proteína PSD-95, un marcador de la post-sinapsis se degrada después de reactivar el trazo de memoria.

IX Conclusiones

Con los resultados podemos concluir que:

En el CAS no es lo mismo almacenar el primer condicionamiento que incorporar el segundo condicionamiento. Indicando que el procesamiento es diferente entre la información nueva y la información que se agrega a un trazo de memoria ya existente.

La actualización del trazo de memoria de aversión a los sabores requiere al menos de la degradación de proteínas en la corteza insular por el sistema UPS.

El efecto de inhibición de la degradación de proteínas por la lactacistina en la corteza insular es específico de la memoria a largo plazo.

Estos resultados tomados en conjunto sugieren que la reestructuración del sistema para almacenar nueva información es selectiva. Siendo crucial la desestabilización del trazo de memoria por el sistema ubiquitina proteosoma para obtener la cualidad dinámica del proceso de memoria.

X REFERENCIAS

Alvin V., Terry, Jr., (2009), “Spatial Navigation (Water Maze) Tasks”, en Buccafusco JJ, (editor), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Capítulo 13. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC press.

Artinian, J., McGauran, A., De Jaeger, X., Mouledous, L., France, B., Roullet, P. (2008) Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. *European Journal of Neuroscience*. 27, 3009–3019

Ashraf, S. I., McLoon, A. L., Sclarsic, S. M. & Kunes, S., (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*, pp. 124, 191-205.

Bekinschtein, P. Cammarota, M., Müller, I., Bevilaqua, L., Izquierdo, I., Medina, J., (2007). Persistence of long term memory storage requires a late protein synthesis –and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53, 261-277,

Berman, D. E. & Dudai, Y., (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, 291, 2417-2419.

Bermudez-Rattoni, F., (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 209-217.

Brown, RE., Milner, PM., (2003). The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. *Nature Review Neuroscience*; 4(12):1013-9.

Cammarota M., Bevilaqua, L., Medina, J., Izquierdo, I., (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance. *Learning and memory*. 11(5):572-8.

Cammarota M., Bevilaqua, L., Köhler, C., Medina, J., Izquierdo, I., (2005). Learning twice is different from learning once and from learning more. *Neuroscience* 132, 273-279.

Curzon, P. Rustay N. & Browman K., (2009). Cued and contextual Fear Conditioning for rodents, en Buccafusco JJ, editor *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Capítulo 2. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC press.

Damasio, A., (2007). El error de Descartes: la emoción, la razón y el cerebro humano. tercera edición, *Crítica*, Barcelona. Páginas: 20, 21, 22 y 28.

Dantuma, N P., Linsten, K., (2010). Stressing the ubiquitin proteasome system. *Cardiovascular research*. 85(2):263-71

Dudai, Y., (2004a). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. *Annual review of psychology*, 55, 51-86.

_____, Y., Eisenberg M., (2004b). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44, 93-100.

_____, (2002) Memory from A to Z, keywords, concepts and beyond. Oxford. *Oxford University press*. 6, 192, 193.

Emptage, N J., Carew, T J., (1993). Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons. *Science*, 262(5131), 253-256.

Escobar, M. L., Bermúdez-Rattoni F., (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain research* 852(1):208-12.

Flexner J. B. Flexner, L. B. Flexner, E. Stellar, G. de la Haba, R. B. Roberts., (1962). Inhibition of protein synthesis in brain and learning and memory following puromycin. *Journal of Neurochemistry*, 9:595-605

Forcato, C., Argibay, P F., Pedreira, M E., Maldonado, H., (2009). Human reconsolidation not always occur when a memory is retrieved: the importance of the reminder structure. *Neurobiology of learning and memory*, 91, 50-57.

Garcia-DeLaTorre, P., Rodriguez-Ortiz, C. J., Arreguin-Martinez, J. L., Cruz-Castaneda, P. & Bermudez-Rattoni, F., (2009). Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learning and Memory*, 16, 514-519

Gold, P.E., (2008), Protein synthesis inhibition and memory: formation vs. amnesia. *Neurobiology of learning and memory*, 89(3):201-11

Hardt O., Szu-Hang W., Nader K., (2009). Storage or retrieval deficit: the yin and yang of amnesia. *Learning and Memory* 16, 224-230

Hegde, A. N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D. G., Martin, K. C., Kandel, E. R. & Schwartz, J. H., (1997). Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell*, 89, 115-126.

Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A., and Medina, J. H., (1998a). Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393:635–636.

_____, Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant'Anna, M. K., Madruga, M., and Medina, J. H., (1998b). Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short- and long-term memory. *Behavioral. Pharmacology*. 9:421–427.

_____, Medina, J. H., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., de Souza, M. M., and Mello e Souza, T., (1998c). Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69:219–224.

Kaang, B.K., Lee, S.H., Kim, H., (2009) Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *Neuroscientist*, (5):430-5

Kandel, E. R. Kupferman I. Iversen S., (2000). Learning and memory. Kandel E.R., Schwartz J., Jessell T., Principles of neural science. Página 1227. *McGraw Hill USA* 4a edición.

_____, (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes, *Science*, 294, 1030-1038.

Lechner, H.A., Squire, L.R., and Byrne, J.H., (1999). One hundred years of consolidation: remembering Muller and Pilzecker, *Learning and Memory*, 6, 77.

Lee, J. L., C. J. Everitt, Barry L. Thomas Kerrie., (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, 304, 839.

_____, (2008 a). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11, 1264-1266.

_____, S., Choi, J. H., Lee, N., Lee, H. R., Kim, J. I., Yu, N. K., Choi, S. L., Lee, S. H., Kim, H. & Kaang, B. K., (2008 b). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, 319, 1253-1256.

Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M. R., Viola, H., Mello e Souza, T., Izquierdo, I., Pasquini, J. M. & Medina, J. H., (2001). The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *European Journal of Neuroscience*, 14, 1820-1826.

Luria AR., (1973). Local brain lesions and localization of functions. The working brain: An introduction to neuropsychology. Página 20. *Basic Books, New York*.

McGaugh, J L., (2000). Memory a century of consolidation. *Science*, 287, 248-251.

Merlo, E. & Romano, A., (2007). Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience*, 147, 46-52.

Nader K. Schafe E. Le doux J E., (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 17 722-726.

_____, (2009). A single standard for memory: the case of reconsolidation. *Nature review neuroscience*, 10, 224-234.

_____, (2010). Memory re consolidation: an update. *Annals of the New York academy of sciences*, 1191, 27-41.

Pedreira, M. E., & Maldonado, H., (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38, 863–869.

_____, Pérez-Cuesta, L M., Maldonado, H., (2004). Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. *Learning and memory*, 11, 579-85.

Peters, J.M. Werner W. Franke S, Kleinschmidtfl, J. (1993). Distinct 19 S and 20 S Subcomplexes of the 26 S Proteasome and Their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm. *Journal of biological chemistry*. 269(10):7709-18

Plunkett. K., Elman, J L., (1997). Learning the English past tense. Exercises in rethinking innateness: a handbook for connectionist simulations. página 203. E.U.A. *MIT press*.

Randall C. O'Reilly (2005). The division of labor between the neocortex and hippocampus. En Houghton, G., editor *Connectionist models in cognitive psychology*. páginas 143,144, 410 y 413. New York (NY): *Psychology press*.

Rodriguez-Ortiz C. J., De la Cruz, V., Guitiérrez, R., Bermúdez-Rattoni, F., (2005), Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning and memory*, 5, 533-537

Rodriguez J. C., Bermudez-Rattoni, F., (2007). Memory reconsolidation or updating consolidation?. En Bermúdez-Rattoni F, editor *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Capítulo 6Boca Raton (FL): *CRC press*.

_____, Balderas, I., Saucedo-Alquicira, F., Cruz-Castañeda, P., Bermúdez-Rattoni, F., (2011), *Neurobiology of learning and memory*, 3, 311-315.

Rodriguiz, R M. and William, C W., (2006). Assessments of cognitive deficit in mutant mouse. en Buccafusco JJ, editor *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Capitulo 12. 2nd edition. Boca Raton (FL): *CRC press*

Paxinos, G. & Watson, C., (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, San Diego, Ca.

Sacks, O., (2001), Antropólogo en Marte: siete relatos paradójicos. *Anagrama*, Barcelona.

_____, (2002), El hombre que confundió a su esposa con un sombrero. *Anagrama*, Barcelona.

Sara, S. J., (2000), Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nature Review Neuroscience*. 3, 212-213.

Shema, R., Sacktor T., Dudai, Y., (2007), Rapid erasure of long term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKMZ. *Science* ,317, 951-953.

Squire, L. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, 15; 61(1): 6-9

Tuoc, T. C., Stoykova, A., (2010), Roles of the ubiquitin-proteosome system in neurogenesis, *Cell cycle*, 9(16):3174-80.

Upadhy, S. C., Smith, T. K. & Hegde, A. N., (2004), Ubiquitin-proteasome-mediated CREB repressor degradation during induction of long-term facilitation. *Journal of Neurochemistry*, 91, 210-219.

Yamamoto T. & Yasunobu Y., (2007). Electrophysiological Representation of Taste Memory. En Bermúdez-Rattoni F, editor Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging. Capítulo 6Boca Raton (FL): *CRC press*.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Fue dirigido por el Dr. Federico Bermúdez Rattoni; con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyectos: 42657/A-1 y 60478 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) proyecto: IN216709.

Agradezco al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por abrirme las puertas de su laboratorio, darme la confianza y la oportunidad de realizar este trabajo, así como sus valiosos comentarios y dirección.

Agradezco al Dr. Carlos J. Rodríguez Ortiz por ser el arquitecto de esta investigación y por brindarme sus comentarios e instrucción durante la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Alejandra Ruiz revisora de este trabajo, al Dr. Octavio García, Dra. Israela Balderas y a la Dra. Martha Escobar, por sus comentarios, correcciones y palabras de aliento.

Agradezco a la Técnica Académica Perla Moreno Castilla por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio.

Agradezco al señor Oreste Carvajal por su apoyo técnico.

Agradecimientos

A mis padres Yolanda Alquicira y Fernando Saucedo y a mi hermano Mauricio Saucedo por su inigualable apoyo en todos estos años por sus consejos y cariño.

A mis tíos y primos por ser mi familia.

A mis amigos, que sin ellos la vida no tendría sabor y las victorias no se disfrutarían. Gracias amigos por las risas, aventuras y el por el buen tiempo que hemos de pasar.

A mí por perseverar y lograr sacar este trabajo.

A la memoria de mi abuelo Francisco Alquicira