



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UN/M  
POSGRADO 

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M.

EL PAPEL DE LA PKA EN LA ACTUALIZACIÓN  
DEL APRENDIZAJE GUSTATIVO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**Daniel Osorio Gómez**

Tutor: Dr. Federico Bermúdez Rattoni

MÉXICO, D. F.

Agosto/2012



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.

A mi esposa, Mireya

## AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 60478 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN216709 .

Agradezco el apoyo del Sr. Oreste Carbajal por su invaluable ayuda.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por su asesoría y a la oportunidad que me brindó para ser parte de su grupo de trabajo.

A la Dra. Diana Escalante Alcalde y a la Dra. Angélica Zepeda Rivera por su tiempo y comentarios que enriquecieron el presente trabajo.

A la Dra. Kioko Guzmán Ramos, por ser un gran ejemplo para mí.

A mis compañeros de laboratorio: Carla, Consuelo, Cristina, Lucía, Mónica, Aketzali, Jorge, Valeria, Fernando y Perla

<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>10</b>
<b>APRENDIZAJE Y MEMORIA .....</b>	<b>10</b>
<b><i>MEMORIA DE CORTO PLAZO A MEMORIA DE LARGO PLAZO; LA CONSOLIDACIÓN.....</i></b>	<b>11</b>
<b>PKA EN CONSOLIDACION .....</b>	<b>13</b>
<b>FOSFORILACIÓN DE LA SUBUNIDAD NR1 .....</b>	<b>14</b>
<b>RECONSOLIDACIÓN Y ACTUALIZACIÓN DE LA MEMORIA.....</b>	<b>16</b>
<b>PKA EN RECONSOLIDACION .....</b>	<b>18</b>
<b>CONDICIONAMIENTO CLÁSICO.....</b>	<b>18</b>
<b>MEMORIA DE RECONOCIMIENTO AL SABOR.....</b>	<b>19</b>
<b>CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR.....</b>	<b>20</b>
<b><i>SUSTRATOS NEURALES DEL CAS.....</i></b>	<b>21</b>
<b>CORTEZA INSULAR.....</b>	<b>22</b>
<b>AMÍGDALA.....</b>	<b>23</b>
<b>CORTEZA INSULAR Y AMÍGDALA, SU RELACIÓN CON EL CAS .....</b>	<b>24</b>
<b>RECONSOLIDACIÓN Y CAS .....</b>	<b>25</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>27</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>28</b>

<b>ANIMALES .....</b>	<b>28</b>
<b>Protocolo conductual pNR1 post-adquisición.....</b>	<b>28</b>
<b>Cuantificación de proteínas.....</b>	<b>29</b>
<b>Western blot .....</b>	<b>29</b>
<b>Análisis de imágenes.....</b>	<b>30</b>
<b>Análisis Estadístico .....</b>	<b>30</b>
<b>RESULTADOS pNR1 post-adquisición .....</b>	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA Experimento microdiálisis en evocación</b> <b>.....</b>	<b>32</b>
<b>Microdiálisis .....</b>	<b>33</b>
<b>Análisis de muestras .....</b>	<b>34</b>
<b>Derivatización.....</b>	<b>34</b>
<b>MECK. ....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS EXPERIMENTO MICRODIÁLISIS EN</b> <b>EVOCACIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>Liberación de Glutamato en la corteza insular durante la evocación del</b> <b>CAS .....</b>	<b>35</b>
<b>Liberación de Glutamato en la amígdala durante la evocación del CAS</b> <b>.....</b>	<b>36</b>
<b>Liberación de Noradrenalina en la amígdala durante la evocación del</b> <b>CAS .....</b>	<b>38</b>
<b>Liberación de Dopamina en la corteza insular durante la evocación del</b> <b>CAS .....</b>	<b>39</b>
<b>Liberación de Dopamina en la amígdala durante la evocación del CAS.</b> <b>.....</b>	<b>40</b>

Consumo de sacarina durante la evocación del CAS.....	41
<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTO Curva temporal pNR1 post-evocación.....</b>	<b>42</b>
Protocolo conductual pNR1 post-adquisición.....	42
<b>RESULTADOS EXPERIMENTO Curva temporal pNR1 post-evocación.....</b>	<b>43</b>
Consumo de sacarina durante la evocación del CAS en la curva temporal de fosforilación.....	45
<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTO Bloqueo de la actividad de PKA durante la evocación .....</b>	<b>46</b>
<b>PROTOCOLO CONDUCTUAL. Bloqueo de la actividad de PKA durante la evocación .....</b>	<b>47</b>
Microinyección.....	47
Análisis estadístico .....	47
<b>RESULTADOS EXPERIMENTO Bloqueo de la actividad de PKA durante la evocación .....</b>	<b>48</b>
<b>DISCUSIÓN. ....</b>	<b>49</b>
Fosforilación de NR1 durante la post-adquisición.....	49
Microdialisis en libre movimiento durante la evocación del CAS.....	51
Curva temporal pNR1 post-evocación.....	53
Bloqueo de la actividad de PKA durante la evocación .....	53
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>54</b>



## **RESUMEN**

LA PROTEÍNA CINASA DEPENDIENTE DE AMP CÍCLICO (PKA) ES UNA CINASA SERINA - TREONINA QUE TIENE UN PAPEL MUY IMPORTANTE EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA. LA FOSFORILACION DE LOS RECEPTORES N-METIL-D-ASPARTATO EN SU SUBUNIDAD NR1 A TRAVÉS DE PKA AUMENTA EL FLUJO DE IONES DE CALCIO DENTRO DE LA CÉLULA, ESTE INCREMENTO ACTIVA CASACADAS DE SEÑALIZACIÓN QUE PROMUEVEN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA. ADEMÁS, SE HA REPORTADO QUE LA PKA INTERVIENE EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE SON NECESARIAS PARA EVOCAR MEMORIAS PREVIAMENTE ESTABLECIDAS.

EN EL PRESENTE TRABAJO SE MIDIÓ, MEDIANTE WESTERN BLOT, LOS NIVELES DE FOSFORILACIÓN EN LA SERINA 897 DE LA SUBUNIDAD NR1 (PNR1) EN LA AMÍGDALA Y EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA POST-ADQUISICION Y EVOCACIÓN DEL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR (CAS), EN ESTA TAREA LOS ORGANISMOS APRENDEN A EVITAR UN SABOR QUE PREVIAMENTE FUE ASOCIADO CON MALESTAR GÁSTRICO. SE SACRIFICARON RATAS MACHO DE LA CEPA WISTAR 42 MINUTOS DESPUÉS DE LA ADQUISICIÓN DEL CAS Y 15, 25, 35 Ó 45 MINUTOS DESPUÉS DE LA EVOCACIÓN; SE DISECTARON MUESTRAS DE LA AMÍGDALA Y DE LA CORTEZA INSULAR.

LOS DATOS MUESTRAN UN INCREMENTO EN PNR1 EN LA AMÍGDALA Y EN LA CORTEZA INSULAR DURANTE LA POST-ADQUISISIÓN DEL CAS. INTERESANTEMENTE DURANTE LA EVOCACIÓN SE OBSERVÓ ÚNICAMENTE EL INCREMENTO EN LA PNR1 EN LA CORTEZA INSULAR LA CUAL DECAE CON EL TIEMPO.

ESTOS RESULTADOS SUGIEREN QUE LA PNR1 TIENE UN PAPEL IMPORTANTE EN LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS, ASIMISMO LA FOSFORILACIÓN PARECE ESTAR INVOLUCRADA EN LA EVOCACIÓN.

## **ABSTRACT**

CYCLIC – AMP DEPENDENT PROTEIN KINASE (PKA) IS A SERINE - THREONINE KINASE THAT PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN VARIOUS FORMS OF SYNAPTIC PLASTICITY. PHOSPHORYLATION OF N-METHYL- D-ASPARTATE RECEPTOR IN THE NR1 SUBUNIT BY PKA INCREASES THE FLUX OF IONS OF CALCIUM INTO THE CELL; THIS INCREMENT ACTIVATES SIGNALING CASCADES THAT PROMOTES CONSOLIDATION OF MEMORIES. MOREOVER, IT HAS BEEN REPORTED THAT PKA SIGNALING PATHWAYS ARE NECESSARY TO RETRIEVE LONG TERM MEMORIES, NEVERTHELESS IT IS UNKNOWN THE MECHANISM BY WHICH THIS OCCURS.

IN THIS STUDY WE MEASURED, THROUGH WESTERN BLOT TECHNIQUE, THE LEVELS OF NR1 PHOSPHORYLATION IN SERINE 897 (PNR1S897) IN THE AMYGDALA AND THE INSULAR CORTEX AT POST- TRAINING AND RETRIEVAL STAGES OF CONDITIONED TASTE AVERSION (CTA), A TASK WHERE ANIMALS LEARN TO AVOID SACCHARIN WHICH WAS PREVIOUSLY PAIRED WITH GASTRIC MALAISE. MALE WISTAR RATS WERE SACRIFICED 42 MINUTES AFTER CTA TRAINING AND 15, 25, 35 OR 45MINUTESAFTER RETRIEVAL; SAMPLES OF AMYGDALA AND INSULAR CORTEX WERE DISSECTED.

OUR DATA SHOWED AN INCREMENT OF PNR1S897 IN AMYGDALA AND INSULAR CORTEX AT POST - ACQUISITION OF CTA COMPARED WITH CONTROL GROUPS. INTERESTINGLY, WE OBSERVED A SIMILAR INCREMENT OF PNR1S897 ONLY IN THE INSULAR CORTEX AT RETRIEVAL OF CTA AND DECAYS OVER TIME, NEITHER AMYGDALA NOR CONTROL GROUPS SHOWED CHANGES IN PNR1S897 LEVELS.

THESE RESULTS INDICATE THAT PNR1S897 BY PKA IN AMYGDALA AND INSULAR CORTEX PLAYS AN IMPORTANT ROLE IN CTA CONSOLIDATION; ADDITIONALLY PNR1S897 IN THE INSULAR CORTEX SEEMS TO BE INVOLVED IN RETRIEVAL OF CTA MEMORY.

## **ANTECEDENTES**

### **APRENDIZAJE Y MEMORIA**

La supervivencia de una especie requiere que sus miembros se comporten de forma adecuada a su entorno, este comportamiento puede llegar a adaptarse al medio ambiente mediante la evolución o el aprendizaje y la memoria (Anderson, 2001).

De tal forma que, el aprendizaje se ha definido como el proceso por el cual ocurren cambios duraderos en el potencial conductual como resultado de la experiencia (Anderson, 2001). Y por otra parte, la memoria se ha definido como el proceso donde el conocimiento, producto del aprendizaje, es codificado, almacenado y después evocado (Kandel et al., 2000). No obstante, debido a que la memoria es un fenómeno muy complejo y de gran diversidad, no es posible estudiar a la memoria como un todo, por lo que se requiere de fraccionarla en componentes más manejables. Dicha división ha acuñado el concepto de sistemas de memoria, donde un sistema de memoria se define como la interacción bajo ciertas reglas de operación entre los mecanismos de adquisición, retención y evocación (Fernández y Bermúdez-Rattoni, 2001). Estos sistemas comparten características en cuanto al proceso del manejo de la información, pero difieren en los propósitos, las manifestaciones cognitivas o conductuales, los principios de operación y los mecanismos cerebrales involucrados (Tulving, 2000).

Entre los sistemas de memoria se encuentran la memoria cognitiva y la de procedimiento, donde la memoria cognitiva, también llamada memoria declarativa o explícita, se ha subdividido en: memoria de trabajo, cuya función es mantener la información “en línea” por períodos pequeños de tiempo mientras operaciones cognitivas son llevadas a cabo; la memoria semántica, donde se adquiere y usa el conocimiento general sobre el mundo; la memoria episódica, la cual tiene acceso a la información personal experimentada en el pasado (Tulving, 2000); y la memoria espacial, cuya función es la de proveer información sobre la relación espacial entre los objetos (Carlson, 2007).

La memoria de procedimiento, también llamada no declarativa o implícita, incluye instancias de memoria perceptual que permiten a los organismos tener un reconocimiento

más rápido de los objetos; memorias motoras, las cuales ajustan automáticamente la posición y corrigen los movimientos al ejecutar ciertas conductas (Carlson, 2007); también se incluyen al aprendizaje asociativo, donde se requiere la asociación espacio – temporal entre estímulos, y el aprendizaje no asociativo, donde se extrae información sobre un solo estímulo. El común denominador de dichas tareas de aprendizaje es una cierta automaticidad en la respuesta (Dudai, 1989).

## **MEMORIA DE CORTO PLAZO A MEMORIA DE LARGO PLAZO; LA CONSOLIDACIÓN**

Casi todos los sistemas de memoria son persistentes en el tiempo, a excepción de la memoria de trabajo, donde se requiere que la información se encuentre “activa” durante un período corto de tiempo mientras se realizan operaciones cognitivas (Fernández, et al., 2001). Richard Atkinson y Richard Shiffrin publicaron una teoría sobre la memoria, donde postulaban que existían dos tipos de almacenamiento: la memoria a corto plazo (MCP) y la memoria a largo plazo (MLP). La MCP se consideró como un sistema de almacenamiento temporal que contendría una cantidad reducida de información. Por su parte, la MLP se consideró como un depósito de conocimiento temporalmente estable sin ninguna limitación aparente de capacidad. (Anderson, 2001). Para la retención del conocimiento a través del tiempo es necesaria la estabilización progresiva de la información en el período posterior a la adquisición, proceso conocido como consolidación de la memoria (Dudai, 2004).

Desde hace mucho tiempo se ha sugerido que las memorias recién adquiridas requieren de tiempo para que éstas perduren, y que en ocasiones, dichos trazos mnémicos pueden ser sujetos a interferencia por estímulos distractores, lesiones, o toxinas; los cuales pierden la efectividad de interferencia con el paso del tiempo (Dudai, 2004). Esto no se había demostrado experimentalmente hasta que se publicó una monografía en la que Georg Elias Müller y su discípulo Alfons Pilzecker describieron experimentos cuya finalidad era identificar las leyes que rigen el establecimiento y la evocación de la memoria. Las conclusiones principales de este trabajo fueron que la fijación de la memoria requiere del paso del tiempo, y que la memoria es muy frágil durante el período de consolidación (Prado-Alcalá y Quirarte, 2007).

Medio siglo después de lo propuesto por Müller y Pilzecker, comenzaron a publicarse varios resultados que demostraban la labilidad de la memoria durante el proceso de consolidación. En 1949, Duncan entrenó diariamente a ratas en una tarea de evitación activa<sup>1</sup>, cada ensayo era seguido por un shock electro-convulsivo, el cual causa un disparo masivo de las neuronas produciendo convulsiones e inconsciencia. Duncan estaba interesado particularmente en la relación entre el aprendizaje y el intervalo de aplicación del shock, así que aplicó shocks electro-convulsivos (SECs) en intervalos desde 20 segundos hasta 14 horas después del entrenamiento. Los resultados indicaban un ligero aprendizaje cuando los SECs se aplicaban 20 segundos después del ensayo; pero cuando se aplicaban una hora posterior al ensayo no parecía tener efecto sobre el aprendizaje (Roberts, 1998). En 1962, Flexner encabezó una serie de trabajos donde entrenaba a roedores en la resolución de laberintos e inyectaba subcutáneamente inhibidores de síntesis de proteínas después del entrenamiento. Sus resultados mostraban un déficit en la resolución de dichos laberintos. Dos años más tarde demostró que la inyección bilateral de inhibidores de síntesis proteica en la región temporal del cerebro afectaba el desempeño de los roedores en el laberinto (Flexner, et al., 1964).

Hoy se sabe que la consolidación de la MLP requiere de la síntesis de proteínas (Squire, 1987); uno de los mecanismos que promueven esto es la activación de cascadas de segundos mensajeros a través del adenilato ciclasa (AC), la cual aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Posteriormente, el factor de la transcripción dependiente de AMPc (CREB) se activa mediante la fosforilación por la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) y la calcio calmodulina cinasa (CaMKII). La fosforilación de CREB promueve el reclutamiento de coactivadores transcripcionales que inducen la transcripción de genes de expresión inmediata, lo cuales, a su vez, activan la transcripción de genes de expresión tardía. Por lo tanto, la transcripción y traducción en la sinapsis modifica la configuración de la misma (Dudai, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la información una vez que ha sido almacenada

---

<sup>1</sup> Tarea de evitación activa: Tarea en la cual, el organismo tiene que pasar de un sitio donde se le dará un choque eléctrico en las patas hacia un sitio seguro.

requiere que sea evocada, esto involucra la reactivación rápida de las memorias que permanecen latentes (Cammarota et al., 2004). Dicha reactivación implica la activación inicial de redes neuronales intrínsecas, la selección de estímulos extrínsecos relevantes, y la integración de estas diferentes fuentes de información en un trazo mnémico con significado (Sara, 2000). La regulación de la evocación se lleva a cabo mediante la intervención de diferentes sistemas de neurotransmisión (Cammarota et al., 2004). Sin embargo aún se desconoce mucho sobre los procesos fisiológicos partícipes en el acto de recordar.

## **PKA EN CONSOLIDACION**

La vía de señalización de la PKA se ha caracterizado en gran detalle en varios tipos de células y órganos. La unión del ligando al receptor acoplado a una proteína G ocasiona el reemplazamiento de GDP por GTP, resultando en la separación de la subunidad  $\alpha$ , la cual activa a la AC aumentando los niveles de AMPc, siendo éste el efector de la PKA (Tasken y Aandahl, 2003).

En ausencia de AMPc, la PKA es una holoenzima tetramérica inactiva con dos subunidades catalíticas (C) unidas de forma no covalente a un dímero de subunidades regulatorias (R) (Skalhegg y Taskén, 1997; Taskén y Aandahl, 2003). Dos moléculas de AMPc se unen a los sitios A y B de cada subunidad R; en su estado inactivo sólo el sitio B está expuesto, y al ser ocupado ocurre un cambio intramolecular estérico que permite la unión del AMPc al sitio A. La unión de cuatro moléculas de AMPc conlleva a un cambio conformacional disociándose el dímero de la subunidad R de los dos monómeros de C (Taskén y Aandahl, 2003). Inicialmente se descubrieron dos isozimas de PKA, hasta ahora se han identificado dos tipos de subunidades R, RI y RII las cuales se pueden encontrar en sus isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ . Además, existen tres tipos de subunidad C con sus isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Skalhegg y Taskén, 1997).

Cuando PKA se encuentra activa, las subunidades C disociadas fosforilan residuos de serina y treonina en proteínas específicas (Skalhegg y Taskén, 1997), la especificidad de acción de la PKA puede ser atribuida a proteínas de anclaje. En el caso de la PKA, la proteína de anclaje de la cinasa A (AKAP por sus siglas en inglés) es la encargada de

realizar dicha tarea (Bauman et al., 2004; Dell'Acqua et al., 2006).

La PKA tiene un papel muy importante en la formación de la memoria, pues se ha descrito ampliamente que la inhibición de su actividad bloquea la consolidación de la memoria en tareas como la evitación pasiva (Zhao et al., 1995), evitación inhibitoria<sup>2</sup> (Bernabeu et al., 1997) y condicionamiento de preferencia al lugar; por el contrario su activación mejora la tarea de evitación inhibitoria (Bernabeu et al., 1997). Además se ha demostrado que el bloqueo de la subunidad R o C impide la estabilización de la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés), el cual es un modelo de aprendizaje y memoria; de forma contraria la aplicación de un agonista de PKA mejora la estabilización de la LTP (Nguyen y Kandel, 1996). También se ha descrito que ratones modificados transgénicamente, en los cuales se expresa una subunidad R inhibitoria, la actividad de PKA en hipocampo se encuentra disminuida, dificultando la estabilización de la LTP y del aprendizaje espacial (Abel et al., 1997).

En un esfuerzo por comprender cuál es el papel de la PKA en la consolidación de la memoria se ha descrito que la PKA fosforila al CREB promoviendo la transcripción y traducción de genes que modifican a la sinápsis (Dudai, 2002). Por otro lado se ha reportado que en la presinapsis PKA fosforila canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, permitiendo una mayor entrada de  $Ca^{2+}$  a la terminal (Huang et al., 1996; Huang y Hsu, 2006). La entrada de  $Ca^{2+}$  en las terminales presinápticas está relacionada con la unión de vesículas sinápticas con la membrana celular, liberando al neurotransmisor que contiene hacia el espacio sináptico (Pigino et al., 2006).

## **FOSFORILACIÓN DE LA SUBUNIDAD NR1**

Es bien conocido que el glutamato regula la mayoría de la neurotransmisión excitatoria en el SNC ya que alrededor del 85% de las sinapsis son glutamatérgicas. Hasta ahora se han identificado tres clases de receptores ionotrópicos de glutamato, el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido  $\alpha$  - amino - 3 - hidroxil - 5 - metil - 4 - isoxazol propiónico (AMPA)

---

<sup>2</sup> Evitación inhibitoria: Tarea donde la rata debe permanecer en dos patas, al bajar los cuartos delanteros se le aplica un choque eléctrico. Se mide el intervalo de tiempo que tarda en tener las cuatro extremidades en el suelo

y el kainato (Hassel y Dingledine, 2006). Estos receptores tienen canales catiónicos no selectivos permitiendo el flujo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y en algunos casos pequeñas cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Cabe destacar que entre estos tres receptores el NMDA es el que permite un mayor flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula, no obstante el paso del  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra bloqueado por el ion  $\text{Mg}^{2+}$  y por lo tanto se requiere que la membrana se despolarice para permitir la salida de este, aunado a esto es necesario que se acople el glutamato y un coagonista, la glicina, para la apertura del canal (Purves et al., 2008).

El receptor NMDA está compuesto generalmente por subunidades NR1 y NR2. Se ha observado que la subunidad NR1 se expresa en todos los receptores NMDA del SNC. Y por otra parte, la subunidad NR2 existe en cuatro isoformas (NR2A, NR2B, NR2C y NR2D) codificados por diferentes genes (Laube et al., 1998). Hasta ahora se conoce que la subunidad NR1 sirve como una subunidad clave para la selectividad de iones y el acoplamiento del agonista al receptor, mientras que la subunidad NR2 es responsable de regular la apertura del canal y de la unión con el  $\text{Mg}^{2+}$  (Cui, et al., 2004).

Aunque existen muchos trabajos sobre la regulación de la subunidad NR2 en el establecimiento de la memoria, también se ha descrito que al inhibir la expresión de la subunidad NR1 se ve afectado de forma negativa el aprendizaje (Kalev-Zylinska et al., 2009), y la retención del trazo mnémico (Cui et al., 2004); por otro lado su sobreexpresión incrementa la consolidación del condicionamiento al miedo (Kalev-Zylinska et al., 2009).

Dada la amplia distribución de receptores NMDA y su participación en procesos que van desde el desarrollo, el aprendizaje y la memoria hasta la muerte neuronal, se ha tratado de comprender los mecanismos que regulan la actividad de estos receptores. Se ha sugerido que la fosforilación de proteínas es el principal mecanismo en la modulación del receptor, debido a que este fenómeno es rápido, reversible y puede resultar en cambios a largo plazo en su funcionamiento (Raymond et al., 1994). Se ha reportado que la PKA es capaz de fosforilar a los receptores NMDA en su subunidad NR1 en la serina 897 (Tingley et al., 1996; Bird et al., 2005) y a DARPP-32, la cual al estar fosforilada se encarga de inhibir la desfosforilación de NR1 (Snyder et al., 1998). Además de la serina 897, la subunidad NR1



tiene otros sitio de fosforilación en la serina 896 la cual es fosforilada por la proteína cinasa C (Emamian et al., 2004). Cuando la subunidad NR1 se encuentra fosforilada se incrementa el paso de iones de  $Ca^{2+}$  a través del receptor NMDA (Raman et al., 1996) favoreciendo la modificación de la sinapsis mediante la síntesis de proteínas

## **RECONSOLIDACIÓN Y ACTUALIZACIÓN DE LA MEMORIA**

Durante mucho tiempo se pensó que la información permanecía estable una vez que esta se consolidaba, sin embargo, en 1968 Misanin y colaboradores describieron que la información puede ser lábil de nueva cuenta en un proceso semejante al de la consolidación. En dicho trabajo, se entrenaron ratas a beber agua dentro de una caja de plástico, esta conducta se midió registrando la tasa de lengüetazos que daba la rata al bebedero; en la segunda parte del entrenamiento se realizó un condicionamiento al miedo, donde las ratas aprendieron la asociación entre un estímulo auditivo y un choque eléctrico en las patas, ocasionando una conducta de congelamiento ante la presencia del tono. El día de la prueba se presentó el bebedero y se registró el número de lengüetazos, el cual disminuía al presentarse el tono auditivo. De forma similar a los demostrado por Duncan en 1949, se observó que la presentación de SECs inmediatamente después del condicionamiento al miedo, no disminuía la tasa de lengüeteo, demostrando una deficiencia en el aprendizaje de la tarea; interesantemente a otro grupo de ratas, 24 horas después del entrenamiento, se les presentó únicamente el tono auditivo e inmediatamente después se les aplicaron SECs, el día de la prueba tampoco se registró una disminución en la tasa de lengüeteo. Cabe destacar que las ratas que no recibieron SECs después de la presentación del tono o que sólo les fue presentado los SECs sin la presentación del tono mostraron una disminución en la tasa de lengüeteo. Este trabajo demostró que las memorias pueden regresar a un estado lábil mediante la reactivación de la memoria, la cual se lleva a cabo con la evocación ante la presentación del tono.

Otros descubrimientos similares (Gordon, 1977) llevaron a sugerir la existencia de dos estados de mnémicos, un estado activo que involucra a las memorias recién adquiridas o reactivadas y un estado inactivo donde la información está consolidada y que no ha sido reactivada (Lewis, 1979).

En 1997 Przybylsky y Sara reportaron que la reactivación de la memoria ocasiona un estado de labilidad, la cual requiere que se reconsolide y es dependiente de los receptores NMDA y  $\beta$  - adrenérgicos. Sin embargo, a partir de los resultados publicados por Nader y cols. (2000) hubo un crecimiento muy importante en la investigación de la reconsolidación; dicho trabajo consistió en el entrenamiento de ratas en una tarea de condicionamiento al miedo, 24 horas después, cuando la memoria ya está consolidada, se reactivó la memoria mediante la evocación de ésta e inmediatamente después se inyectó en la amígdala basolateral un inhibidor de síntesis de proteínas ocasionando amnesia. Estos datos llevaron a proponer que las memorias no se consolidan sólo una vez ya que pueden regresar a un estado lábil después de ser evocadas y que requieren de su reconsolidación o reestabilización (Nader y Hardt, 2009).

El fenómeno de reconsolidación ha sido demostrado en un gran número de especies, tareas y agentes amnésicos (Nader y Einarsson, 2010); no obstante se ha descrito que la reconsolidación se puede ver limitada entre otras cosas por la intensidad del entrenamiento (Eisenberg et al., 2003), el tiempo de reactivación de la memoria (Pedreira y Maldonado, 2003) y la antigüedad del trazo mnémico (Milekic y Alberini, 2002; Suzuki et al., 2004).

Ahora, ¿cuál sería la función de la reconsolidación? Se ha sugerido que la reconsolidación sirve para actualizar la información almacenada en la memoria. Por lo tanto la reconsolidación no sólo reestabiliza el trazo previo, sino es un proceso que permite una modificación adaptativa de la información (Lee, 2009). Existen datos que favorecen esta idea; se ha descrito que el aprendizaje en humanos de una nueva lista de palabras después del recordatorio de una lista previamente aprendida ocasiona una interferencia el día de la prueba, observado por la mezcla de palabras, sin embargo si no se da el recordatorio la interferencia es menor (Hupbach et al., 2007). Asimismo se logró demostrar que la reconsolidación favorece el fortalecimiento (actualización) de la tarea de condicionamiento al miedo contextual (Lee, 2008). De tal manera que la capacidad de realizar cambios plásticos en la fuerza de la memoria o de su contenido después de la reactivación parece ser un mecanismo adaptativo para mantener la relevancia de la información y guiar así la conducta. (Lee, 2009).

Dado que se ha postulado a la reconsolidación de la memoria como un mecanismo importante de la actualización de la información, es posible integrar al fenómeno de la reconsolidación en teorías de aprendizaje y memoria. En 1972 Rescorla y Wagner propusieron un modelo matemático que permite predecir cuánto aprende un organismo, ésta teoría propone que el aprendizaje es proporcional a la diferencia entre la fuerza de asociación entre los estímulos que posee el organismo después de cada entrenamiento y la fuerza máxima que se puede desarrollar (Anderson, 2001). Por lo tanto, a partir del primer entrenamiento, la reconsolidación puede servir como mecanismo por el cual el aprendizaje se va modificando hasta alcanzar ésta fuerza de asociación máxima (Lee, 2009).

### **PKA EN RECONSOLIDACION**

La PKA ha sido estudiada ampliamente en el proceso de consolidación, aunque no así en el de la reconsolidación (Koh y Bernstein, 2003; Tronson et al., 2006; Kemenes et al., 2006; Sánchez et al., 2010). No obstante, todos los datos publicados hasta ahora favorecen la idea de la participación de PKA en la reconsolidación, siendo el reporte publicado por Kemenes y colaboradores (2006) el más claro. En este trabajo se entrenó a un caracol *Lymnaea stagnalis* a presentar la conducta de mordida ante la presentación de un estímulo químico cuando este fue asociado a comida previamente. Se midió la actividad de PKA de los ganglios cerebrales después de la reactivación de la memoria y se reportó un incremento en la actividad de PKA en los organismos entrenados. Asimismo se bloqueó la actividad de PKA después de la reactivación mediante la inyección de una antagonista y se obtuvo una disminución en la tasa de mordidas el día de la prueba. Este reporte claramente indica la participación de PKA en la reconsolidación.

### **CONDICIONAMIENTO CLÁSICO**

El condicionamiento clásico es un tipo de aprendizaje asociativo descubierto por Iván Pavlov, quien estudió la fisiología digestiva y los reflejos gástricos (Bermúdez- Rattoni, et al., 2001). Hoy en día se sabe que para establecer un condicionamiento clásico es necesario seleccionar un estímulo que provoque una respuesta característica; este estímulo es llamado estímulo incondicionado (EI), y la respuesta es llamada respuesta incondicionada (RI); el

término incondicionado es usado para establecer el significado de que la conexión entre el estímulo y la respuesta no es aprendida. El siguiente elemento necesario para el establecimiento del condicionamiento clásico es el estímulo condicionado (EC), el cual, puede ser cualquier estímulo que inicialmente no ocasione la RI; el término condicionado indica que únicamente después de que el condicionamiento se ha llevado a cabo, el EC será capaz de provocar la RI; dicha respuesta es llamada respuesta condicionada (RC) (Mazur, 2006).

Para obtener un condicionamiento, se comienza con la adquisición por asociaciones repetidas (Bermúdez – Rattoni, et al. 2001), es decir, se requiere la repetición de los pareamientos entre el EC y el EI para que la RC se establezca. En los primeros ensayos, puede o no haber una ligera RC ante el EC, con pareamientos posteriores la RC incrementa gradualmente. La parte del proceso del condicionamiento clásico en la cual, el sujeto experimenta los pareamientos EC – EI y la RC aparece gradualmente e incrementa es llamada fase de adquisición (Mazur, 2006). Los EIs que son mayores en tamaño o intensidad logran establecer asociaciones más fuertes (Anderson, 2001), además se requiere de menor número de ensayos para que la RC aparezca (Mazur, 2006).

## **MEMORIA DE RECONOCIMIENTO AL SABOR**

Una de las habilidades de supervivencia más útiles que los animales han desarrollado a través de la evolución es la memoria de reconocimiento al sabor. La memoria de reconocimiento es la habilidad para recordar las cosas previamente encontradas, y en el caso particular de la comida, cuando un animal encuentra un nuevo sabor muestra una reducción en el consumo del mismo; una respuesta neofóbica. Cuando el nuevo sabor no tiene consecuencias negativas, el organismo incrementará su consumo en encuentros posteriores y comenzará a reconocer el sabor como seguro, proceso llamado atenuación de la neofobia. Pero si el nuevo sabor es asociado con enfermedad, los organismos evitan dicho sabor la próxima vez que lo encuentren desarrollando una aversión de larga duración (Bermúdez – Rattoni, 2004).

Por lo tanto, dadas las variaciones del ambiente, los organismos deben aprender qué

alimentos son seguros para comer y cuáles no. La mayoría de los alimentos se caracterizan por tener un sabor específico, así que es importante reconocer los sabores que señalan “seguridad” o “malestar” con el fin de consumir todos aquellos alimentos que son benéficos y evitar aquellos que son potencialmente dañinos (Welzl, et al. 2001). La característica distintiva de este aprendizaje es la asociación que se forma entre los estados viscerales (señalados a través de aferencias viscerales) y estímulos externos (mediados por aferencias gustativas, olfativas, visuales o somatosensoriales) (Bures, 1998a).

### **CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR.**

Una gran variedad de organismos pueden desarrollar aversiones a comida o a líquidos con sabores específicos en su hábitat natural (Welzl, et al., 2001); sin embargo, estudiar este fenómeno fuera del laboratorio resulta demasiado complejo. No fue sino hasta 1955, cuando John García y colaboradores lograron introducir dicho fenómeno al laboratorio; su trabajo consistió en entrenar a ratas para que estas bebieran agua con sacarina mientras eran expuestas a rayos gamma<sup>3</sup>, los cuales ocasionan malestar gastrointestinal. Cuando de nuevo se presentó la sacarina a las ratas, estas mostraron un menor consumo, obteniendo una aversión al sabor (García, et al., 1955). Este paradigma ahora se conoce como condicionamiento aversivo al sabor (CAS).

La adquisición de la aversión al sabor representa y sigue las reglas del condicionamiento clásico, siendo la sustancia inductora de malestar el EI y la náusea la RI. El estímulo gustativo se convierte en el EC (Welzl, et al., 2001) y las RCs son: la apertura del hocico, sacudidas de cabeza, limpiar la piel y la lengua con las patas delanteras, dejar caer la sustancia o frotar el hocico contra el piso y las paredes (Bures, 1998b). Sin embargo, la medición de dichas conductas resulta complicada, por lo que una vez que el EC ha adquirido las propiedades de una señal aversiva, la medición del CAS se realiza con la medición de la ingesta del EC durante la re-exposición del EC en días posteriores (Yamamoto, et al., 1998).

El CAS ha sido exitosamente utilizado como un paradigma de aprendizaje y memoria en roedores (Welzl, et al. 2001) debido a que se conocen de manera amplia las estructuras

---

<sup>3</sup> Rayos gamma: radiación producida por elementos radiactivos, en este caso cobalto 60

cerebrales involucradas en este aprendizaje, presenta una rápida adquisición (Yamamoto, 1993) y por ser un condicionamiento de trazo el CAS puede ser inducido aún cuando existe un largo intervalo de tiempo entre el EC y el EI. Estas características permiten un mejor entendimiento de la formación de asociaciones y la comprensión de los eventos celulares y bioquímicos para la formación de una memoria a largo plazo (Bures, 1998a; Bermúdez – Rattoni, 2004). Además en el CAS se han observado fenómenos como la generalización, extinción, inhibición condicionada, bloqueo, condicionamiento de segundo orden, inhibición latente y ensombrecimiento (Mazur, 2006; Bures, 1998b), fenómenos característicos del condicionamiento clásico (Bermúdez – Rattoni, et al., 2001; Bures, 1998b; Mazur, 2006)

### **SUSTRATOS NEURALES DEL CAS**

En diversos laboratorios se han investigado los sustratos neurales del CAS, esto se ha logrado mediante la utilización de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas, anatómicas y de lesiones cerebrales y que han resultado en la descripción de las vías neurales para los estímulos gustativos y viscerales. De forma simplificada, la vía gustativa de la lengua alcanza la parte rostral de núcleo del tracto solitario (NTS) a través de los pares craneales VII, IX, y el X (Bermúdez-Rattoni, 2004), estas neuronas mandan sus axones ipsilateralmente hacia el núcleo parabraquial (NPB) en su porción medial a través de la formación reticular (Yamamoto, et al. 1994). El NPB proyecta fibras a la porción parvocelular del núcleo ventro-posterior-medial del tálamo (Bermúdez-Rattoni, y Yamamoto, 1998), al hipotálamo lateral (Li, et al., 2004), al núcleo cama de la estricta terminalis, a la amígdala central (ACe) y a la amígdala basolateral (ABL). Además el núcleo ventro-posterior-medial del tálamo proyecta a la corteza insular en su porción agranular (CI) (Reilly, 1999).

Existen al menos dos vías por las cuales el estímulo que provoca el malestar llega al sistema nervioso central (Bermúdez-Rattoni, 2004). Esto depende del tipo de estímulo, si el estímulo irrita el sistema gastrointestinal, la información es enviada a través del décimo par craneal y si el malestar es a causa de toxinas en la sangre o de movimientos que causan náusea, la información proviene del área postrema (Bermúdez-Rattoni, et al., 1998), teniendo como sitio de llegada la porción caudal del NTS, de ahí se proyectan fibras a los subnúcleos laterales del NPB (Yamamoto, et al., 1994). Las aferencias de la porción lateral del NPB

llegan a la parte parvocelular de núcleo ventroposterolateral del tálamo y a la ABL, además la CI en su porción granular recibe proyecciones de la porción visceral del tálamo (Bermúdez-Rattoni, et al., 1998).

La vías viscerales y gustativas convergen en varias estructuras cerebrales, donde el malestar y el sabor pueden ser asociados para crear el trazo de memoria (Bermúdez-Rattoni, 2004) Figura 4.; la adquisición del CAS cambia los patrones de actividad en respuesta al EC en el NTS, PBN, amígdala (Welzl, et al., 2001) y en la CI (Acolla, et al., 2007).

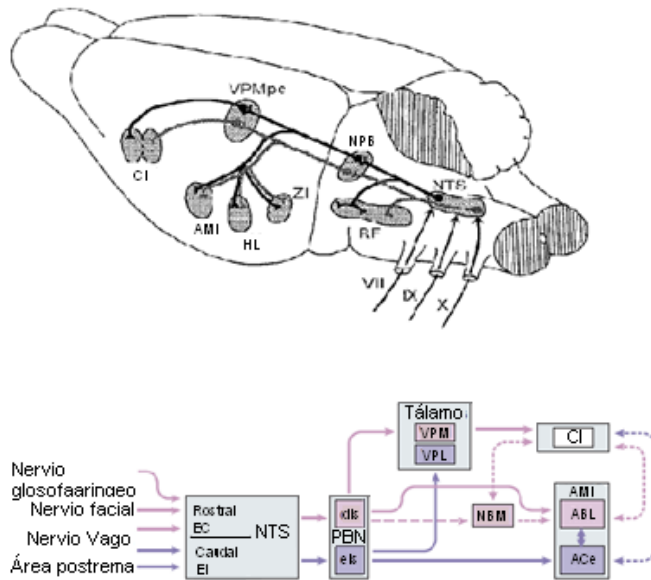


Figura 4 A) Dibujo esquemático de las vías centrales gustativas y viscerales en el cerebro de rata. (Yamamoto et al, 1998). B) Esquema de las vías cerebrales principales del CAS (Bermúdez – Rattoni, 2004). Núcleo del tracto solitario (NTS); núcleo Parabraquial (PBN); núcleo basal magnocelular (NBM); núcleo ventro-postero-medial del tálamo (VPM); núcleo ventro-postero-lateral del tálamo (VPL); amígdala central (ACe); amígdala basolateral (ABL); corteza insular (CI).

## CORTEZA INSULAR

La corteza insular (CI) está delimitada dorsalmente por la corteza somatosensorial y ventralmente por el surco rinal, el nombre de corteza insular es debida a su posición por encima del claustrum. La corteza insular muestra una transición citoarquitectónica, marcado por un cambio dorsoventral de tres regiones granular, disgranular y agranular. La corteza granular se caracteriza principalmente por una capa bien desarrollada de células granulares

(capa IV) y la densidad de ésta capa es resaltada por la relativamente escasa capa V. La capa III contiene células piramidales y es casi el doble de la lámina IV; la capa II y II son fácilmente discernible como entidades separadas y la corteza agranular se sitúa en el labio dorsal del surco rinal, además es más delgada que la región cortical dorsal agranular y posee una banda intermedia más delgada de pequeñas células piramidales (Kosar et al., 1986).

## **AMÍGDALA**

El término amígdala se origina del griego almendra, la cual describe burdamente la masa ovoidal de materia gris encontrada en la porción medial del lóbulo temporal en los primates y forma parte del sistema límbico<sup>4</sup>, sin embargo, en la rata, la amígdala difícilmente tiene forma de almendra, pero la mayoría de sus núcleos componentes son los mismos que los encontrados en primates (Alheid, et al., 1994).

Los núcleos de la amígdala se encuentran divididos en tres grupos:

1. Grupo profundo o basolateral, el cual contiene a los núcleos lateral (AL), el cual es llamado también basolateral (ABL); accesorio o basomedial (ABM) y el basal (AB) (Pitkänen, et al., 2000) .
2. Grupo superficial o corticomedial, este grupo incluye a los núcleos del tracto olfatorio lateral (NTOL), núcleo cama del tracto accesorio olfatorio (NCTAO), los núcleos anteriores y posteriores corticales (CoA y CoP, respectivamente) y la corteza periamigdaloides (Pitkänen, et al., 2000; Sah, et al., 2003).
3. Grupo centromedial consiste de los núcleos central (ACe), medial (AM) y la porción amigdaloides del núcleo cama de la stria terminalis (NCST) (Sah, et al., 2003).
4. Y un grupo de núcleos que no entran fácilmente en estas categorías y que incluyen al área anterior de la amígdala (AAA), el área amigdalohipocampal (AAH) y los núcleos intercalados (Sah, et al., 2003).

---

<sup>4</sup> Sistema límbico: conjunto de estructuras cerebrales involucradas en las emociones.



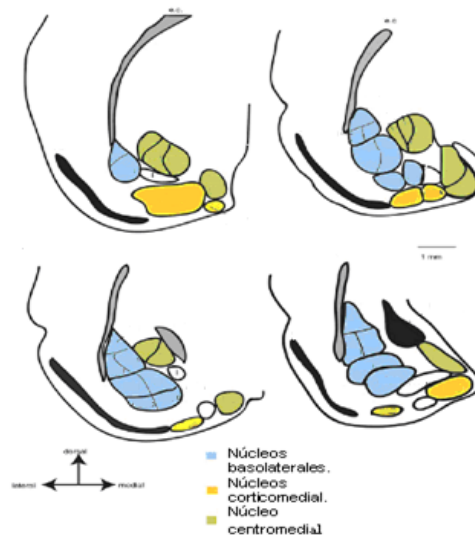


Figura 5. Esquema de cortes coronales donde se observan los diferentes grupos nucleares de la amígdala de rata (modificado de Sah, et al., 2003)

## CORTEZA INSULAR Y AMÍGDALA, SU RELACIÓN CON EL CAS

Se ha reportado ampliamente que se requiere de la integridad funcional de la CI para la adquisición, consolidación y evocación del CAS (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991), semejante a esto se ha descrito que la amigdalotomía bilateral en la porción medial (Kolb, et al., 1977), así como la remoción de la AL (Fitzgerald y Burton, 1983) ocasiona déficit en el establecimiento del CAS.

Además, existen reportes donde lesiones que abarcan los núcleos AM, ACe, ABL, CoA y ABM, hechas mediante excitotoxicidad<sup>5</sup>, disminuyen el establecimiento del CAS, dicho déficit depende de forma directamente proporcional con la dimensión de la lesión (Yamamoto et al., 1995). Igualmente, si se lesiona la región central de la CI no se adquiere el CAS (Nerad et al., 1999).

Aparte de las lesiones excitotóxicas, se ha detallado que las ratas con lesiones electrolíticas<sup>6</sup>, que involucran a los tres grupos de núcleos amigdalares (Kesner, et al., 1992),

<sup>5</sup> Excitotoxicidad: Lesión producida por la inyección intracerebral de un amino ácido excitador.

<sup>6</sup> Lesión electrolítica: Lesión producida por el paso de corriente a través de un filamento expuesto.

conjuntamente a los núcleos ACe, ABL, AM, y ABM, (Schafe y Bernstein, 1996); o únicamente ABL (Aggleton. et al, 1981; Borsini y Rolls, 1984; Fitzgerald y Burton, 1983; Rollins, et al., 2001) no adquieren la tarea de CAS. Las lesiones electrolíticas hechas en la CI también producen déficits en la adquisición y evocación del CAS (Cubero et al., 1999). Además se ha visto que la inactivación temporal, mediante la inyección intracerebral de tetrodotoxina (TTX)<sup>7</sup> en la amígdala o en la CI causa la atenuación del CAS (Gallo, et al., 1992).

Por otra parte se ha monitoreado mediante microdiálisis *in vivo* la adquisición y post-adquisición del CAS en la CI (Guzmán-Ramos et al., 2010) y en la amígdala (Guzmán-Ramos et al., 2012), durante dicho monitoreo se encontró que en la post-adquisición del grupo condicionado existe una liberación de glutamato y dopamina en la CI y para el caso de la amígdala se registró un incremento de glutamato y noradrenalina. Cabe destacar que estas señales glutamatérgicas y catecolaminérgicas participan en el proceso de consolidación, ya que el bloqueo en la CI de los receptores NMDA o D1 mediante inyecciones intracerebrales que fueron realizadas 30 minutos después de la adquisición del CAS ocasionó un déficit en la consolidación del CAS (Guzmán-Ramos et al., 2010). En el caso de la amígdala, se bloqueó a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos o NMDA 30 minutos después de la adquisición del CAS y los animales no lograron consolidar la memoria gustativa de aversión (Guzmán-Ramos et al., 2012). Cabe recordar que tanto los receptores  $\beta$ -adrenérgicos como los D1 son receptores metabotrópicos cuya cascada de señalización incluye la activación de PKA.

Asimismo, se ha encontrado que la inhibición de la actividad de PKA en la amígdala (Koh et al., 2002) y en la CI (Guzmán-Ramos et al., 2010) disminuye la consolidación del CAS; además se ha reportado que ratones transgénicos, que no expresan la subunidad R de la PKA en la amígdala, mostraron dificultad para consolidar dicha tarea (Koh et al., 2003).

## **RECONSOLIDACIÓN Y CAS**

La reactivación del CAS mediante la presentación del estímulo gustativo ocasiona un

---

<sup>7</sup> Tetrodotoxina: Compuesto obtenido del pez globo que bloquea canales de Na<sup>+</sup>, evitando potenciales de acción

estado de labilidad en el trazo mnémico, esto se ha demostrado a través de los siguientes experimentos, después del condicionamiento aversivo al sabor, el día de la prueba se les presentó de nueva cuenta el EC, posteriormente se aplicó estimulación eléctrica intracraneal en la CI (Stenberg et al., 2009) o se inyectó vía i.p. un inhibidor de síntesis de proteínas (Gruest et al., 2004) lo cual ocasionó que se debilitara el trazo mnémico observado como un incremento en el consumo del EC en una segunda prueba. También se ha reportado que la reactivación del trazo mediante la presentación del contexto donde fue adquirido el CAS puede producir un estado de labilidad en la memoria de aversión al sabor, ya que al inyectar un inhibidor de síntesis proteica después de presentar el contexto se debilita la aversión al sabor (Flint y Marino, 2007). De forma similar se ha descrito que el bloqueo de la actividad de PKA antes o después de la reactivación del CAS mediante la presentación del EC ocasiona una disminución en la fortaleza del trazo, pues esta conducta tiende a extinguirse más rápido (Koh y Bernstein, 2003).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hasta ahora los datos que se han obtenido sobre el papel de PKA en la memoria no han permitido comprender cómo es que la PKA podría regular los procesos de consolidación, evocación, reconsolidación y actualización de la memoria.

Se ha postulado que la actividad de PKA en diferentes estructuras podría estar modulando diferentes procesos mnémicos, uno de los mecanismos propuestos para esta modulación es la fosforilación de la subunidad NR1 en la serina 897 del receptor NMDA que al encontrarse fosforilado permite un mayor paso de iones  $Ca^{2+}$  facilitando la plasticidad sináptica de los circuitos neuronales involucrados en el aprendizaje de una tarea.

Tanto la CI y la amígdala son dos estructuras que tienen una actividad importante en la adquisición, consolidación y evocación del CAS; asimismo se ha observado una sinergia entre el sistema glutamatérgico y la actividad de PKA; no obstante se desconoce cómo es que esta interacción estaría regulando estos procesos en la memoria.

## **OBJETIVO.**

Evaluar el papel de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico en los procesos de consolidación, evocación y actualización de la memoria aversiva al sabor.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Medir cambios en la fosforilación en la serina 897 de la subunidad NR1 del receptor NMDA en la CI y amígdala durante la consolidación del CAS.

Monitorear mediante microdiálisis en libre movimiento la respuesta de liberación del sistema glutamatérgico, noradrenérgico y dopaminérgico durante la evocación del condicionamiento aversivo al sabor. \*

Medir cambios en la fosforilación en la serina 897 de la subunidad NR1 del receptor NMDA en la CI y amígdala en la evocación del CAS.

Medir cambios en la fosforilación en la serina 897 de la subunidad NR1 del receptor NMDA en la CI y amígdala en la actualización del CAS.

Modular la actividad de PKA mediante la inyección de agonistas y antagonistas en la amígdala y CI en las diferentes etapas del CAS.

## **HIPÓTESIS.**

Existe un aumento en la fosforilación de la ser 897 de NR1 en la CI y amígdala en la post-adquisición del grupo condicionado en comparación de los grupos no condicionados.

Durante la evocación existe un aumento en la fosforilación en la ser 897 de NR1 en la CI y amígdala en el grupo condicionado en comparación de los grupos no condicionados.

La actualización de la información está modulada por la actividad de PKA

## **METODOLOGÍA.**

### **ANIMALES**

Se emplearon ratas de la cepa Wistar machos de 280 -300g de peso provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y ciclo luz – oscuridad de 12/12. Todas las manipulaciones y procedimientos experimentales se realizaron en la fase de luz. Los animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*, excepto cuando se indique lo contrario.

### **PROTOCOLO CONDUCTUAL PNR1 POST-ADQUISICIÓN.**

Los animales fueron privados de agua por 24 horas. Durante los siguientes 5 días se les proporcionó 10mL de agua durante 15 minutos por la mañana, a través de una probeta graduada y un tapón de corcho horadado con una boquilla metálica que funcionó como bebedero.

El día de la adquisición de les suministró los siguientes estímulos dependiendo el grupo:

- Cage. No se les suministró ningún estímulo, eran animales con agua y comida *ad libitum*
- H<sub>2</sub>O – LiCl, 10mL de agua y pasados 15 minutos se inyectó i.p. LiCl 0.4M (Baker, NJ.) en una dosis de 7.5 mL/kg.
- Sac – LiCl, 10mL de sacarina 0.1% (Sigma – Aldrich, MO.) y pasados 15 minutos se inyectó i.p. LiCl 0.4M (Baker, NJ.) en una dosis de 7.5 mL/kg
- Sac – NaCl, 10mL de sacarina 0.1% (Sigma – Aldrich, MO.) y pasados 15 minutos se inyectó i.p. NaCl 0.4M (Baker, NJ.) en una dosis de 7.5 mL/kg.

Después de 42 minutos al condicionamiento, las ratas fueron sacrificadas y se extrajo la amígdala y la CI, cada estructura fue colocada en 150  $\mu\text{L}$  de Buffer de lisis (50nM Tris-HCl pH 7.5, 150nM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium desoxycholate, 1 tableta de inhibidor de proteasas, ROCHE), la muestra se homogeneizó por medio de un sonicador, (Branson Sonifier 250) y después se congelaron las muestras a  $72^\circ\text{C}$ .

## **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.**

La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante el método de Lowry (Kit BIO-RAD), midiendo cada muestra por cuadruplicado.

## **WESTERN BLOT**

Se diluyó 20 µg de homogenado de cada muestra a 1:1 en solución Laemli buffer con 5% de β - mercaptoetanol, después se hirvió durante 5 minutos.

Las muestras se cargaron en geles de acrilamida 10% (gel separador a pH 8.8 al 12%, Tris 37.29 mM pH 8.8, 0.1% SDS 3.4mM, Acrilamida 70mM, 15 µl de TEMED y 75 µl APS 21.79mM; y gel concentrador pH 6.8 al 4%, Tris pH 6.8, 0.12mM, 0.1%SDS 51mM, Acrilamida 32mM, 15 µl de TEMED y 80 µl APS 6.4mM).

Los geles se montaron en una cámara de Western Blot (BIO-RAD Mini PROTEAN 3 cell); cada gel tiene 10 carriles: un carril para el marcador de peso molecular y 9 para las muestras. Una vez cargadas las muestras, la cámara fue conectada a un regulador Power Pac 200 de BIO-RAD a 100 V por 120 minutos a temperatura ambiente, en buffer de corrida (Tris Base 25mM, Glicina 0.19M, SDS 2.88M).

Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana PVDF (Bio-Rad) mediante una cámara de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell); las membranas y los geles se equilibraron en buffer de transferencia (Tris base 25mM, Glicina 0.19M, SDS 2.88M y Metanol 20%) por 15 minutos. La transferencia se llevó a cabo a 25 V por 50 minutos. Terminada la transferencia se colocó la membrana en Leche baja en grasa al 3% diluido en TBS-T (Tris base 9.9 mM, NaCl 0.15M, y Tween al 0.1%) y se dejó por 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

Las membranas se colocaron en anticuerpo primario (anti pNR1 ser897, Cell-signaling, 1:1000) disuelto en TBS-T con BSA al 5% toda la noche a 4°C en agitación constante. Al terminar se realizaron cuatro lavados de 7 minutos cada uno con TBS-T. Posterior a los lavados se colocó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-rabbit, Zygmond

1:10,000) disuelto de la misma forma durante una hora y media a temperatura ambiente y agitación constante. Finalmente se realizaron 4 lavados de 7 minutos cada uno en TBS-T.

Finalmente las membranas fueron colocadas en una solución de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate de PIERCE). Las membranas fueron reveladas en placa reveladora Kodak BioMax MR Film, Scientific imaging film.

Se eluyó la membrana con buffer de elusión (glicina 0.1M, SDS 0.5%, pH 2.5) a 70 °C dos veces por 20 minutos, se realizaron cuatro lavados de 7 minutos cada uno con TBS-T y se bloqueó de nuevo con Non Fat Dry Milk 3% en TBS-T durante dos horas a T.A. se realizaron cuatro lavados de 7 minutos cada uno con TBS-T y se incubó el anticuerpo primario anti NR1 (Cell-signaling, 1:1000) disuelto en TBS-T con BSA al 5% toda la noche a 4°C en agitación constante. Al terminar se realizaron cuatro lavados de 7 minutos cada uno con TBS-T. Posterior a los lavados se colocó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-rabbit, Zygmond 1:10,000). Se realizaron 4 lavados de 7 minutos cada uno en TBS-T y se reveló.

Para verificar una carga homogénea de la muestra se incubó con anti-GAPDH (1:1000) y con anti-mouse (1:30000) con el mismo procedimiento que se incubaron los anteriores anticuerpos.

### **ANÁLISIS DE IMÁGENES.**

Las placas fotográficas fueron digitalizadas y las densidades de píxeles se determinó por medio del programa Image J v.1.31.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para determinar la diferencia estadística en la densitometría y en la conducta se usó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Para determinar diferencias entre los tratamientos se utilizó el análisis *post hoc* de Fisher.

## RESULTADOS PNR1 POST-ADQUISICIÓN

Los resultados indican que en la CI existen diferencias significativas ( $F_{(4,30)} = 3.742$ ,  $p = 0.013$ ) 42 minutos después de la adquisición del CAS en los niveles de fosforilación de NR1 en la serina 897. Un análisis *post-hoc* mostró que existen diferencias entre el grupo SAC-LiCl con respecto a los grupos H<sub>2</sub>O-LiCl ( $p = 0.0018$ ), SAC-NaCl ( $p = 0.020$ ) y CAGE ( $p = 0.0031$ ) Figura 6.

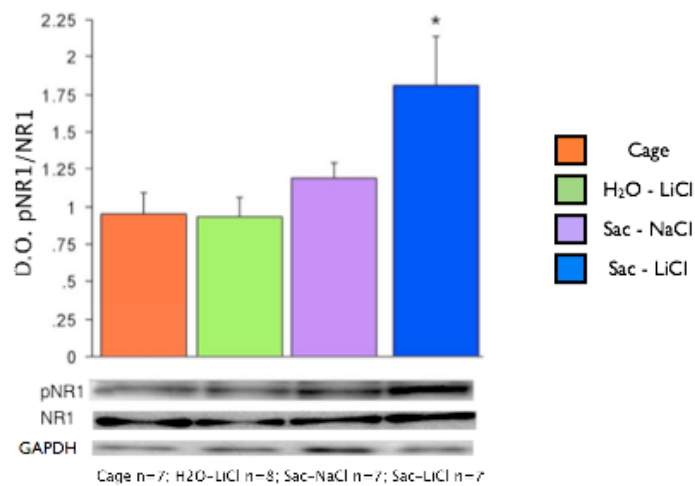


Figura 6. Fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA en un homogenado de CI. Las muestras fueron obtenidas 42 minutos después del condicionamiento. Los resultados se muestran como la densidad óptica de pNR1 entre la proteína total  $\pm$ ES. Cage n=7; H<sub>2</sub>O n=8; Sac-NaCl n=7; Sac-LiCl n=7. \* $p < 0.05$

De igual forma en la amígdala existen diferencias significativas ( $F_{(3,13)} = 15.189$ ,  $p = 0.0002$ ) en los niveles de fosforilación de NR1 en la ser897 42 minutos después de la adquisición del CAS. Un análisis *post-hoc* mostró que existen diferencias entre el grupo SAC-LiCl con respecto a los grupos H<sub>2</sub>O-LiCl ( $p = 0.0007$ ), SAC-NaCl ( $p = 0.0002$ ) y CAGE ( $p = 0.0001$ ). Figura 7



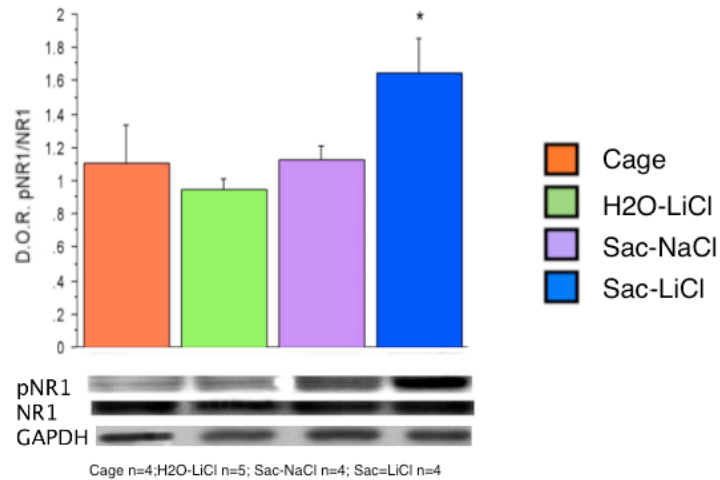


Figura 7. Fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA en un homogenado de AMY. Las muestras fueron obtenidas 42 minutos después del condicionamiento. Los resultados se muestran como la densidad óptica de pNR1 entre la proteína total  $\pm$ ES. Cage n=4; H<sub>2</sub>O n=5; Sac-NaCl n=4; Sac-LiCl n=4 \*p<0.05

Estos dos resultados muestran que en la CI y en la amígdala existe un aumento en la fosforilación en la subunidad NR1 producto del condicionamiento aversivo al sabor ya que los grupo controles no muestran este incremento.

### **METODOLOGÍA EXPERIMENTO MICRODIÁLISIS EN EVOCACIÓN**

Los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina a una dosis de 84 mg/kg (Anesket, PiSA agropecuaria, México) y xilacina (Procin, PiSA agropecuaria, México) a una dosis de 0.4 mg/kg. Ya bajo anestesia, se les implantó dos cánulas guía (CMA, Suecia) en la amígdala y en la corteza insular (AP = -2.8, L= -4.8, y DV= -7.5, AP = 1.2, L= 5, y DV= -4.5 respectivamente) (Paxinos y Watson, 1998), de acuerdo a procedimientos estereotáxicos convencionales; las cánulas se fijaron mediante un soporte de dos tornillos y cemento dental acrílico. Para evitar posibles infecciones, se aplicó una mezcla de antibiótico, antimicótico y yodo. El tiempo de recuperación postquirúrgico fue de cinco días.

### **PROTOCOLO CONDUCTUAL EXPERIMENTO MICRODIÁLISIS EN EVOCACIÓN**

Los animales fueron privados de agua por 24 horas. Al sexto día de la implantación de

cánula. Durante los siguientes 5 días, mientras se habituaban en la cámara de microdiálisis (Bioanalytical System Inc., E.U.A, se les proporcionó 30 mL de agua durante 15 minutos, a través de un bebedero. Al finalizar la habituación, se les dio un segundo consumo de 20 mL de agua por la tarde para evitar la deshidratación.

El día del condicionamiento se les suministró los siguientes estímulos dependiendo del grupo:

Sacarina – LiCl, 30 mL de sacarina 0.1% (Sigma – Aldrich, MO) y pasados 15 minutos se inyectó i.p. LiCl 0.2M (Baker, NJ) en una dosis de 7.5 mL/kg (SAC/LiCl, n=7).

Sacarina – NaCl, 30 mL de sacarina 0.1% y pasados 15 minutos se inyectó i.p. NaCl 0.2 M en una dosis de 7.5 mL/kg (Baker, NJ) (SAC/NaCl, n=4).

Sacarina novedosa, 30 mL de sacarina 0.1% presentada únicamente el día de la prueba (Sac nov n=5)

Durante los dos siguientes días al condicionamiento se les proporcionó 30 mL de agua por día.

La prueba se realizó 72 horas después del condicionamiento, con la presentación de 30 mL de sacarina 0.1% durante 15 minutos realizando la microdiálisis *in vivo*

La sacarina se utilizó como sabor novedoso (EC) y el LiCl como inductor de malestar gástrico (EI); además se ha visto que la inyección i.p. de NaCl no funciona como EI.

### **MICRODIÁLISIS<sup>8</sup>**

El día de la evocación del CAS se conectaron las sondas de microdiálisis, con una membrana de 1 mm de largo para la amígdala y de 3 mm para la corteza insular, (CMA, Suecia) al sistema de microinfusión (CMA, Suecia) el cual, perfundió solución Ringer (NaCl 118mM, KCl 4.7mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, NaHCO<sub>3</sub> 19mM, Glucosa 3.3mM) a una velocidad de 0.8  $\mu$ L/min en la amígdala y de 1.0  $\mu$ L/min en la CI. Una vez que las sondas se insertaron a la cánulas guía, los primeros 60 minutos de dializado fueron

---

<sup>8</sup> Microdiálisis: Técnica utilizada para recolectar sustancias químicas del fluido extracelular; el principio de la microdiálisis se basa en la difusión.

descartados, y después las muestras se recolectaron cada 5 minutos para la amígdala (4.0  $\mu\text{L}$ /muestra) y 4 minutos para la CI (4.0  $\mu\text{L}$ /muestra) en tubos eppendorf de 200  $\mu\text{L}$  que contenían 0.5  $\mu\text{L}$  de mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.27mM, ácido acético 0.1M). Las primeras tres muestras fueron utilizadas como línea basal y a partir de la cuarta se comenzó la exposición del estímulo condicionado para la evocación del CAS. El monitoreo duró 40 minutos (8 muestras).

Las muestras se congelaron inmediatamente para ser analizadas posteriormente por electroforesis capilar micelar (MECK por sus siglas en inglés).

### **ANÁLISIS DE MUESTRAS**

El análisis se realizó mediante electroforesis capilar micelar por detección de fluorescencia inducida por láser, para lo cual se requería de un proceso de derivatización.

### **DERIVATIZACIÓN<sup>9</sup>.**

El procedimiento de derivatización consistió en lo siguiente: se secaron al vacío alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de FQ<sup>10</sup> ((3-(2-furoil)quinolina-2-carboxaldehído, Molecular Probes Invitrogen, E.U.A.) 10mM; una vez secas, se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de KCN 25mM, 4.5  $\mu\text{L}$  de la muestra y 1  $\mu\text{L}$  de estándar interno<sup>11</sup> (O-metil-L-treonina 7.5 mM), la mezcla se hizo reaccionar en la oscuridad por 15 min a 65 °C en un baño termostatzado.

### **MECK<sup>12</sup>.**

El amortiguador de corrida empleado para la separación de los neurotransmisores de interés contenía boratos 35 mM, duodecil sulfato de sodio (SDS) 25 mM,  $\beta$ -ciclodextrinas 5 mM 17% de metanol grado HPLC, pH final 9.6. La inyección fue hecha hidrodinamicamente

---

<sup>9</sup> Derivatización: Modificación de los analitos que permite la unión de un grupo fluorescente la cual incrementa la selectividad de detección y su sensibilidad.

<sup>10</sup> FQ: Grupo fluorescente que reaccione específicamente con aminas primarias y que forma conjugados que pueden ser analizados por métodos electroforéticos. El FQ se excita a 480nm.

<sup>11</sup> Estándar interno: Aminoácido no presente en la recolección de la muestra pero que fue añadido con fines de referencia.

<sup>12</sup> MECK: técnica analítica instrumental de separación la cual permite la identificación y cuantificación de los analitos; la separación es mediante el uso de micelas en un amortiguador de separación.

aplicando 0.5 psi de presión durante 5 s en el contenedor de la muestra para llenar una porción del capilar (sílica fundida, 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 50 cm de largo) y la separación se hizo aplicando 25 kV. Para la detección de los compuestos se empleó detección de fluorescencia inducida por láser con un láser de ionización de argón con luz a 488 nm (Beckman Coulter P/ACE MDQ Glycoprotein system).

Cada neurotransmisor fue identificado en el electroferograma comparando el patrón de migración con otro electroferograma, donde cada neurotransmisor se encontraba resaltado, para su identificación; los picos obtenidos se corrigieron relacionando el área bajo la curva de la muestra con el área bajo la curva del estándar interno. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Karat System Gold. Todos los resultados se muestra en porcentaje con respecto a la liberación durante la línea basal (%LB= concentración\*100/media de las tres primeras muestras).

Para cada grupo se utilizó la prueba ANOVA de dos vías y la prueba *post hoc* de Fisher para analizar los cambios en el porcentaje de liberación con respecto al grupo y al tiempo. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo. Todos los análisis fueron hechos con Statview v4.57 (Abacus concepts Inc, E.U.A.).

Para analizar las diferencias en el consumo de sacarina 0.1% durante la evocación entre los diferentes grupos, se utilizó la prueba ANOVA de una vía teniendo una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## **RESULTADOS EXPERIMENTO MICRODIÁLISIS EN EVOCACIÓN**

### **Liberación de Glutamato en la corteza insular durante la evocación del CAS**

Los resultados indicaron que existe una diferencia significativa en la liberación de glutamato a través del monitoreo ( $F_{(2,107)} = 5.906$ ,  $p = 0.0037$ ), dichos cambios en la liberación dependen del protocolo conductual aplicado a los grupos ( $F_{(16,107)} = 1.832$ ,  $p = 0.0358$ ). Un

análisis posterior permitió observar en qué tiempos existían cambios en la concentración extracelular de glutamato durante el monitoreo, para los grupos Sac nov y Sac-NaCl no se observaron cambios significativos con respecto a la línea basal; el grupo Sac-LiCl muestra cambios significativos con respecto a la línea basal ( $F_{(8,42)}= 2.493$ ,  $p=0.026$ ). El análisis *post hoc* demostró que los cambios fueron al minuto 24 ( $p=0.011$ ).

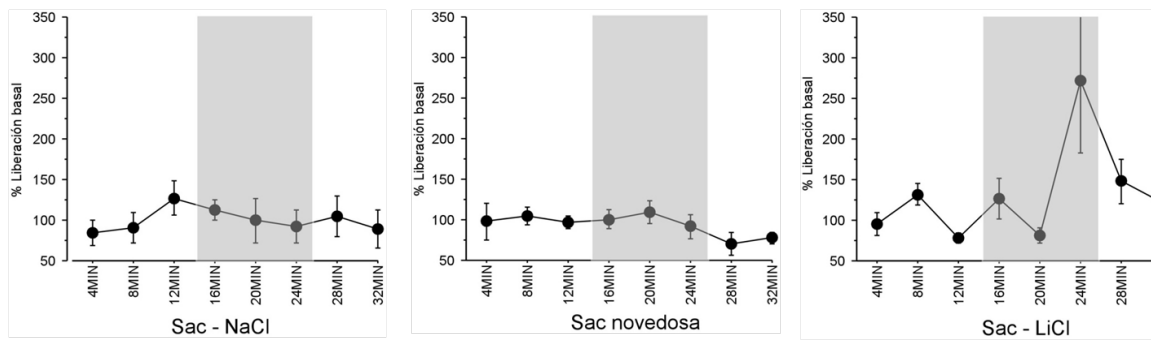
### **Liberación de Glutamato en la amígdala durante la evocación del CAS**

Los resultados mostraron que existe una diferencia significativa en la liberación de glutamato entre los grupos ( $F_{(2,138)}= 6.803$ ,  $p=0.0015$ ). De manera similar a la corteza insular, no se observaron cambios significativos con respecto a la línea basal para los grupos Sac nov y Sac-NaCl; el grupo Sac-LiCl muestra cambios significativos en la liberación de glutamato en el tiempo con respecto a la línea basal ( $F_{(8,71)}= 2.027$ ,  $p=0.05$ ). El análisis *post hoc* demostró que los cambios fueron al minuto 25 ( $p=0.02$ ).

Por lo tanto, no existe un cambio en la concentración de glutamato ante la presentación de sacarina 0.1% para los grupos sacarina Novedosa y para Sac-NaCl en la corteza insular ni en la amígdala, sin embargo existen cambios en la liberación de glutamato ante la evocación del CAS en dichas estructuras. Figura 8.

Entonces, la evocación de un sabor que previamente ha sido asociado a malestar gástrico ocasiona un incremento extracelular en los niveles de glutamato en la CI y en la amígdala. Por el contrario, la novedad de un sabor y un sabor que no ha sido condicionado aversivamente no muestran incrementos en los niveles basales de glutamato.

### a) CI



### b) Amígdala.

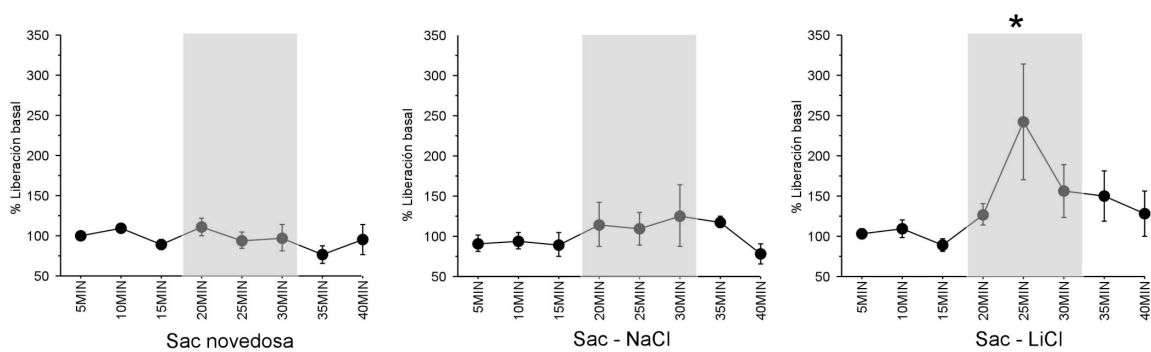


Figura 8. Porcentaje de liberación de glutamato en a) Corteza insular y b) Amígdala con respecto a la línea basal de liberación. La barra gris indica el tiempo en el cual estuvo presente la sacarina 0.1%. Los resultados se muestran en porcentaje de liberación con respecto a la línea basal  $\pm$ ES. \*  $p < 0.05$

## Liberación de Noradrenalina en la corteza insular durante la evocación del CAS

Los resultados mostraron que existe una diferencia significativa en la concentración de noradrenalina extracelular en la corteza insular durante el tiempo de monitoreo ( $F_{(8,102)} = 2.051$ ,  $p = 0.0476$ ). En el caso del grupo Sac-NaCl no se observan cambios en la liberación de noradrenalina durante la presentación de la sacarina 0.1%, no obstante el grupo Sac-LiCl muestra cambios en los niveles de noradrenalina extracelular ( $F_{(8,41)} = 6.803$ ,  $p = 0.0005$ ) en el minuto 24 ( $p = 0.003$ ). Cuando se utiliza la ANOVA de dos vías no se observan cambios significativos en el grupo Sacarina Novedosa, sin embargo un análisis posterior hecho con

ANOVA de una sola vía, arroja que en el minuto 24 existen diferencias en la liberación de noradrenalina ( $p=0.029$ ).

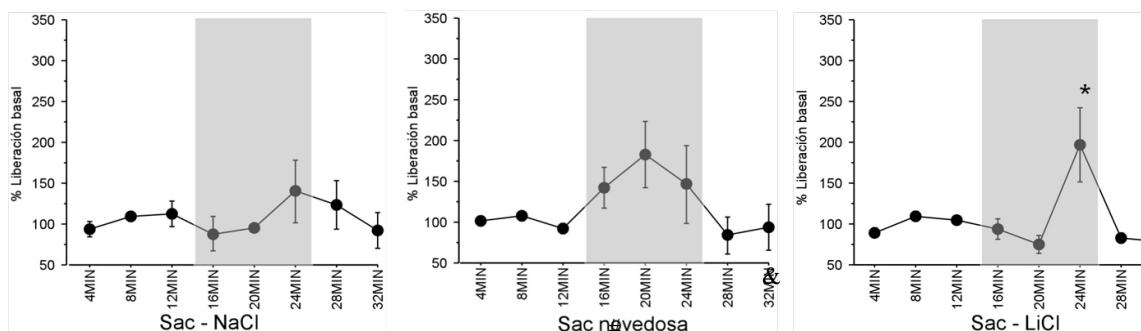
### **Liberación de Noradrenalina en la amígdala durante la evocación del CAS**

Aún cuando el análisis no muestra diferencias significativas en la liberación de noradrenalina en la amígdala considerando a todos los grupos, se realizó de nueva cuenta un análisis posterior grupo por grupo para ver si había cambios en cada grupo por separado. En el caso del grupo Sac-NaCl no se observan cambios en la liberación de noradrenalina durante la presentación de la sacarina 0.1%, sin embargo el grupo Sac-LiCl muestra cambios en los niveles de noradrenalina extracelular en el minuto 20 ( $p=0.047$ ). En el caso del grupo Sac novedosa se pueden observar diferencias en la liberación de noradrenalina ( $F_{(8,44)}=6.669$ ,  $p=0.0001$ ) en el minuto 25 ( $p=0.049$ ).

Aunque la variabilidad de los datos no permite obtener conclusiones, se puede observar una tendencia en la corteza insular y en la amígdala de presentar cambios en la concentración extracelular de noradrenalina, además el grupo de sac novedosa también muestra una tendencia de que existan cambios en los niveles de norpinefrina. Figura 9.

Al parecer el sabor novedoso y el sabor asociado previamente con malestar produce un incremento en la liberación de noradrenalina en la amígdala y en la CI.

a) CI



b) Amígdala.

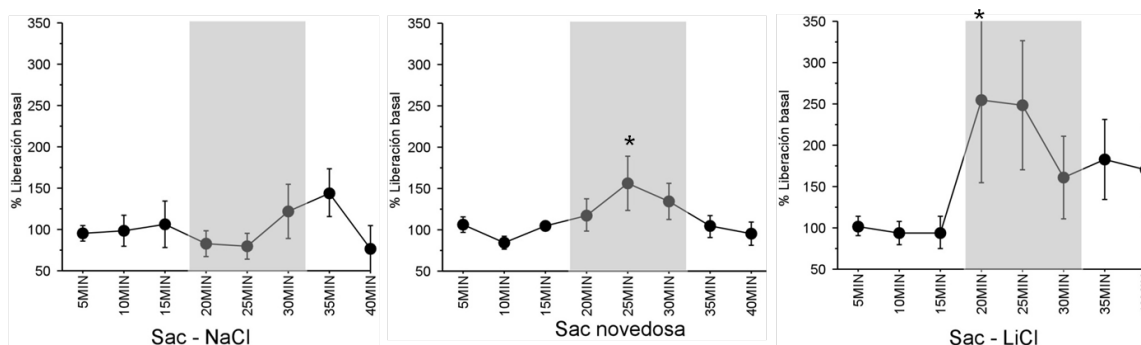


Figura 9. Porcentaje de liberación de noradrenalina en a) Corteza insular y b) Amígdala con respecto a la línea basal de liberación. La barra gris indica el tiempo en el cual estuvo presente la sacarina 0.1%. Los resultados se muestran porcentaje de liberación con respecto a la línea basal \* p<0.05

### Liberación de Dopamina en la corteza insular durante la evocación del CAS

Los resultados mostraron que existe una diferencia significativa en los niveles de dopamina extracelular a través del tiempo ( $F_{(8,99)} = 5.336$ ,  $p = 0.0001$ ). Se observan diferencias en la liberación de dopamina en el minuto 24 para el grupo Sac-NaCl ( $p = 0.018$ ), Sac-LiCl ( $p = 0.0019$ ), y para el grupo Sac novedosa ( $p = 0.001$ ).



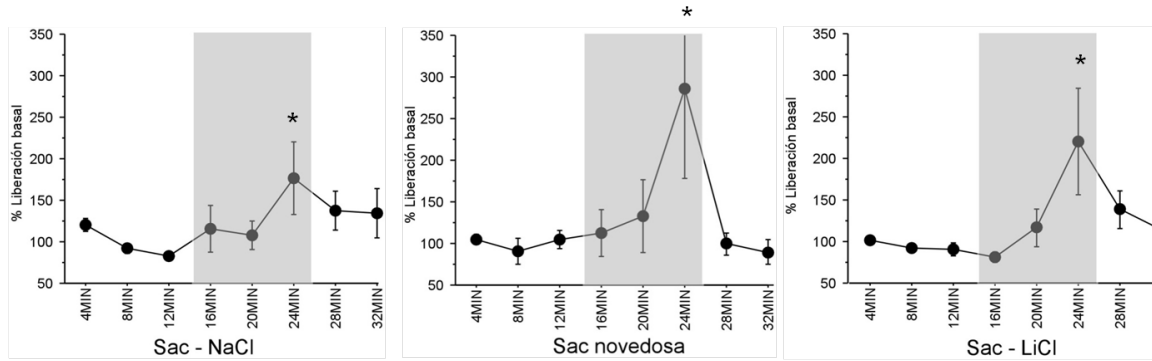
### **Liberación de Dopamina en la amígdala durante la evocación del CAS.**

En el caso de la amígdala el análisis no muestra diferencias en la liberación de dopamina, no obstante se analizó grupo por grupo y se obtuvo que ni el grupo Sac-NaCl ni el grupo sac novedosa muestran cambios en los niveles de dopamina. El único grupo que muestra una diferencia significativa en los niveles de dopamina extracelular es el de Sac-LiCl en el minuto 25 ( $p=0.0258$ ).

La liberación de dopamina en la corteza insular muestra cambios en sus niveles ante la presentación de sacarina 0.1% en todos los grupos; en la amígdala sólo se observan diferencias en el grupo condicionado. Figura 10.

La concentración de dopamina en la CI cambia al presentar un sabor sin importar si es novedoso, seguro o aversivo. En el caso de la amígdala este incremento sólo se produce ante la presencia de un estímulo asociado con malestar gástrico.

a) CI



b) Amígdala.

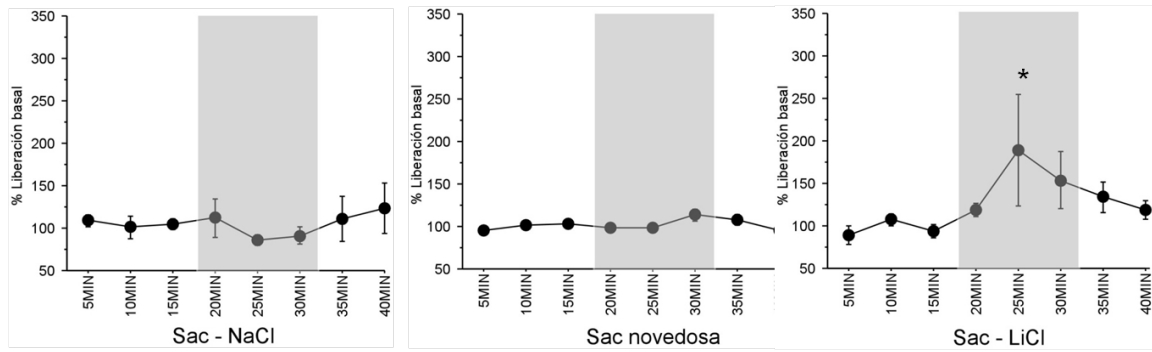


Figura 10. Porcentaje de liberación de dopamina en a) Corteza insular y b) Amígdala con respecto a la línea basal de liberación. La barra gris indica el tiempo en el cual estuvo presente la sacarina 0.1%. Los resultados se muestran porcentaje de liberación con respecto a la línea basal. \*  $p < 0.05$

**Consumo de sacarina durante la evocación del CAS.**

Para evaluar la eficacia del CAS entre los diferentes grupos, se midió el consumo de sacarina 0.1%. Los resultados muestra que existen diferencias en el consumo ( $F_{(2,11)} = 4.540$ ,  $p = 0.0340$ ). Figura 11.

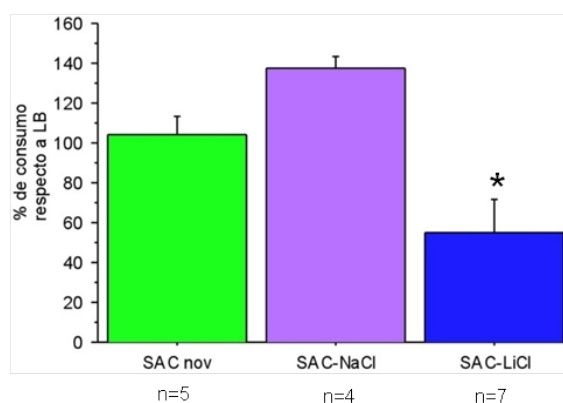


Figura 11. Consumo de sacarina en la evocación como porcentaje relativo al consumo de agua durante la línea basal en animales condicionados y no condicionados. Se muestra la media  $\pm$  ES \*  $p < 0.05$

El consumo de sacarina en el día de la prueba muestra que el grupo Sac-LiCl tiene una clara aversión en comparación de los grupos controles.

## METODOLOGÍA EXPERIMENTO CURVA TEMPORAL PNR1 POST-EVOCACIÓN

### PROTOCOLO CONDUCTUAL PNR1 POST-ADQUISICIÓN.

Se utilizaron dos grupos conductuales: condicionamiento retrógrado (LiCl-Sac) y CAS (Sac-LiCl), se ha descrito que el condicionamiento retrógrado es ineficiente para adquirir una tarea (Mazur, 2006); inicialmente los animales fueron privados de agua por 24 horas. Durante los siguientes 5 días se les proporcionó 30 mL de agua durante 15 minutos por la mañana.

El día del condicionamiento se les suministró los siguientes estímulos dependiendo el grupo:

- Condicionamiento retrógrado (BWD), se inyectó i.p. LiCl 0.4M en una dosis de 7.5 mL/kg y pasados 15 minutos se les presentó 30mL de sacarina 0.1%
- CAS (FWD), 30 mL de sacarina 0.1% y pasados 15 minutos se inyectó i.p. LiCl 0.4M en una dosis de 7.5 mL/kg.

La prueba ocurrió 72 horas después del condicionamiento con la presentación de 30 mL de sacarina 0.1% durante 15 min, las ratas fueron sacrificadas 15, 25, 35 y 45 min

después de la evocación; se extrajeron la amígdala y CI.

Se cuantificó la concentración de proteínas muestras y se realizó la técnica de western blot utilizando el mismo protocolo para el experimento de pNR1 post-adquisición.

Se digitalizaron los blots y fueron analizados mediante Image J, se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías y las prueba *post hoc* de Fisher. El consumo de sacarina durante la prueba fue analizado con la prueba T de Student no pareada.

### **RESULTADOS EXPERIMENTO CURVA TEMPORAL PNR1 POST-EVOCACIÓN.**

El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas en los niveles de fosforilación de la subunidad NR1 entre los grupos FWD y BWD ( $F_{(1,76)}=4.555$ ,  $p=0.0360$ ) en la CI; en el análisis *post hoc* se observó que en el grupo FWD existen diferencias entre los minutos 15 y los 45 ( $p=0.0354$ ). En el caso del grupo BWD no se observan cambios en la fosforilación a través del tiempo. Además, al comparar el grupo FWD y el BWD en el minuto 15 se observa un cambio significativo en los niveles de fosforilación ( $p=0.0316$ ). Esto nos indica que sólo el grupo condicionado muestra una mayor fosforilación en la serina 897 de la subunidad NR1 15 minutos después de la evocación y que esta actividad decae con el tiempo. Figura 12.

En el caso de la amígdala no se notaron cambios significativos en la fosforilación en la serina 897 de la subunidad NR1 a través del tiempo ni entre los grupos. Figura 13.

Corteza Insular

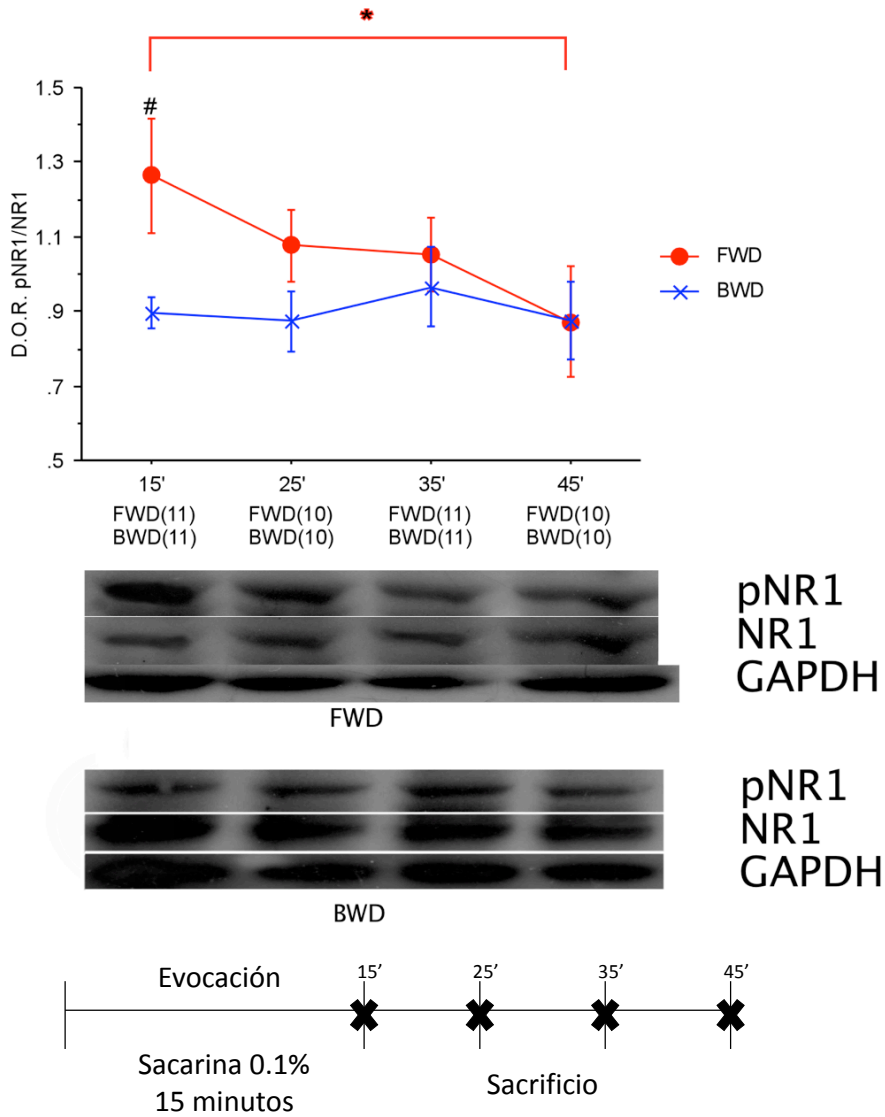


Figura 12. Fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA de un homogenado de CI (FWD 15 min n=11; FWD 25 min n=10; FWD 25 min n=11; FWD 45 min n=10; BWD 15 min n=11; BWD 25 min n=10; BWD 35 min n=11; BWD 45 min n=10). Las muestras fueron obtenidas 15, 25, 35 y 45 min después de la evocación. Los resultados se muestran como la densidad óptica relativa de pNR1 entre la NR1  $\pm$  ES \*  $p < 0.05$  a lo largo del tiempo y #  $p < 0.05$  en el minuto 15' entre grupos

## Amígdala

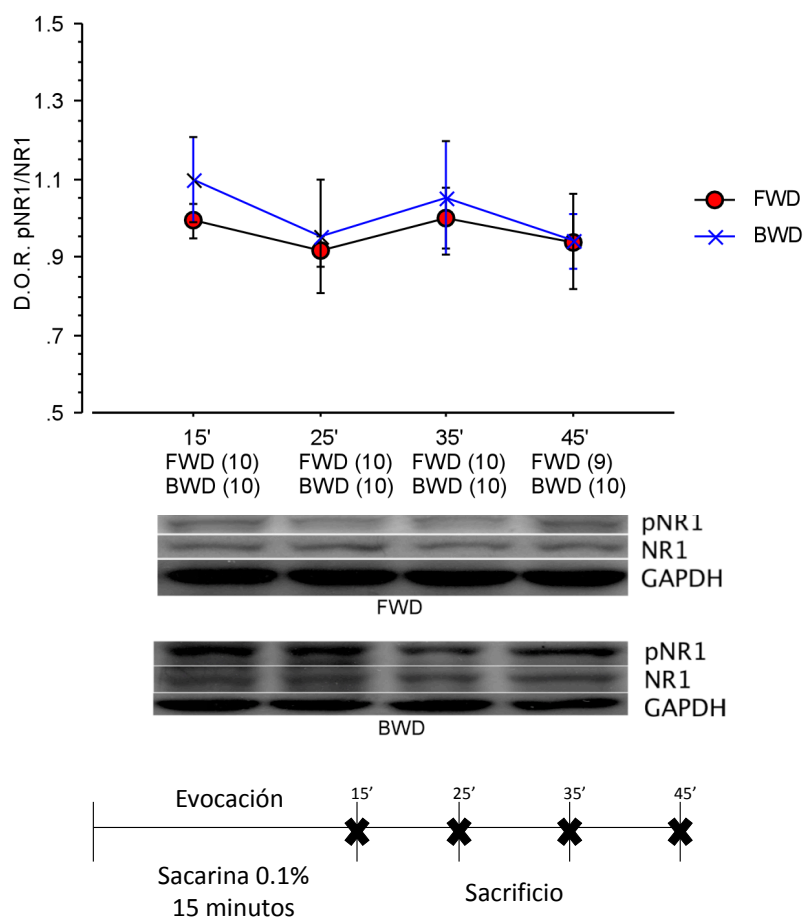


Figura 13. Fosforilación de la subunidad NR1 del receptor NMDA de un homogenado de amígdala (FWD 15 min n=10; FWD 25 min n=10; FWD 35 min n=10; FWD 45 min n=9; BWD 15 min n=10; BWD 25 min n=10; BWD 35 min n=10; BWD 45 min n=10). Las muestras fueron obtenidas 15, 25, 35 y 45 min después de la evocación. Los resultados se muestran como la densidad óptica relativa de pNR1 entre la NR1  $\pm$  ES \*  $p < 0.05$

### Consumo de sacarina durante la evocación del CAS en la curva temporal de fosforilación.

Se midió el consumo de sacarina 0.1% y se evaluó si existían diferencias en el consumo de sacarina durante la evocación entre los dos grupos. Los resultados muestran que existen diferencias en el consumo ( $t = -45.625$ ,  $p < 0.001$ ). El grupo de FWD muestra un menos consumo de sacarina en comparación al grupo BWD, Figura 14.

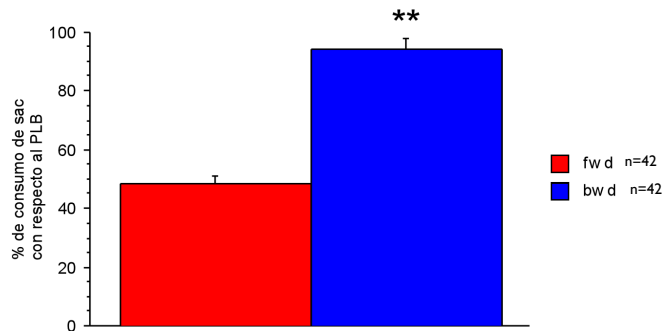


Figura 14. Consumo de sacarina en la evocación como porcentaje relativo al consumo de agua durante la línea basal en animales con FWD (n=42) y en animales con condicionamiento BWD (n=42). Se muestra la media  $\pm$  ES \*\*  $p < 0.001$

Dado que en la microdiálisis durante la evocación del CAS se observa una liberación conjunta de glutamato con el sistema catecolaminérgico tanto en la corteza insular como en la amígdala; y además existe un aumento en la CI en la fosforilación de la subunidad NR1 se desarrolló el siguiente experimento para comprender cuál es el papel de PKA en la evocación y sus repercusiones en la conducta del organismo.

### **METODOLOGÍA EXPERIMENTO Bloqueo de la actividad de PKA durante la evocación**

Los animales fueron sometidos a la implantación bilateral de cánulas guía de 12 mm de largo y 23 Ga en la amígdala basolateral, de acuerdo a procedimientos estereotáxicos convencionales (AP= -2.8, L=  $\pm$ 5, y DV= -6.5, con respecto a Bregma) (Paxinos y Watson, 1998); las cánulas fueron fijadas mediante un soporte de dos tornillos y cemento dental acrílico. Se colocó en el interior de las cánulas un estilete de alambre de acero inoxidable con el fin de evitar la obstrucción. Para evitar posibles infecciones, se aplicó una mezcla de antibiótico, antimicótico y yodo. El tiempo de recuperación postquirúrgico fue de cinco días.

## **PROTOCOLO CONDUCTUAL. BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE PKA DURANTE LA EVOCACIÓN**

Los animales fueron privados de agua por 24 horas al sexto día después de la implantación de cánulas. Durante los siguientes 5 días se les proporcionó por la mañana 30ml de agua durante 15 minutos, a través de un bebedero, se registraron los consumos que sirvieron como línea base.

El día de la adquisición, se les presentó 30 mL de sacarina 0.15% y 15 minutos después se les inyectó i.p. LiCl 0.2M, 7.5ml/kg. Durante los dos días siguientes se restableció el esquema de consumos utilizados para la línea base; la Prueba 1 se realizó a las 72 hrs, la Prueba 2 y 3 se realizaron 24 y 48 horas después de la Prueba 1 respectivamente.

### **MICROINYECCIÓN**

Los animales fueron manipulados aproximadamente por tres minutos durante los días de registro de línea base. El día de la Prueba 1, se retiraron los estiletes y se insertaron los inyectoras dentales con un largo de 14.5 mm, los cuales estaban conectados por medio de una tubería de polietileno a dos jeringas de microinyección de 10  $\mu$ l (Hamilton Co., E.U.A.) montadas en una bomba automática de microinfusión (Cole – Parmer, E.U.A.). El volumen inyectado fue de 0.5  $\mu$ l por hemisferio a una velocidad de 0.25  $\mu$ l/min. Los inyectoras se dejaron un minuto más para permitir la difusión del fármaco.

Las microinyecciones se efectuaron de acuerdo a los siguientes grupos:

- Solución Salina. NaCl 0.9% (n=3) 15 minutos antes de la Prueba 1
- Rp-AMPC (antagonista de la actividad de PKA). Rp AMPC (n=4) (Sigma – Aldrich, MO.) 9.0  $\mu$ g/0.5  $\mu$ L de NaCl 0.9%, 15 minutos antes de la Prueba 1.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El consumo de sacarina durante las diferentes pruebas fue normalizado contra la línea basal y fue comparado mediante la prueba ANOVA de dos vías.



## RESULTADOS EXPERIMENTO BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE PKA DURANTE LA EVOCACIÓN

El análisis muestra que existen diferencias en el consumo de sacarina entre los grupos ( $F_{(1,25)}=0.760$ ,  $p=0.0302$ ) y en el consumo de sacarina en las diferentes pruebas ( $F_{(4,25)}=8.623$ ,  $p=0.002$ ). En un análisis post hoc se puede observar que tanto en el grupo control como en el grupo experimental existen diferencias significativas en el consumo de sacarina entre la adquisición y la Prueba 1 ( $p=0.0113$  y  $p=0.0011$ ); entre la Prueba 1 y la Prueba 2 ( $p=0.0251$  y  $p=0.0275$ ) y entre la Prueba 1 y la Prueba 3 ( $p=0.0133$  y  $p=0.0010$ ), lo cual indicaría que ambos grupos muestran una clara extinción del CAS. No obstante, a pesar que hay diferencias en el consumo de sacarina entre grupos cuando se hace un análisis más detallado a diferentes tiempos no se logró identificar diferencia alguna. Figura 15.

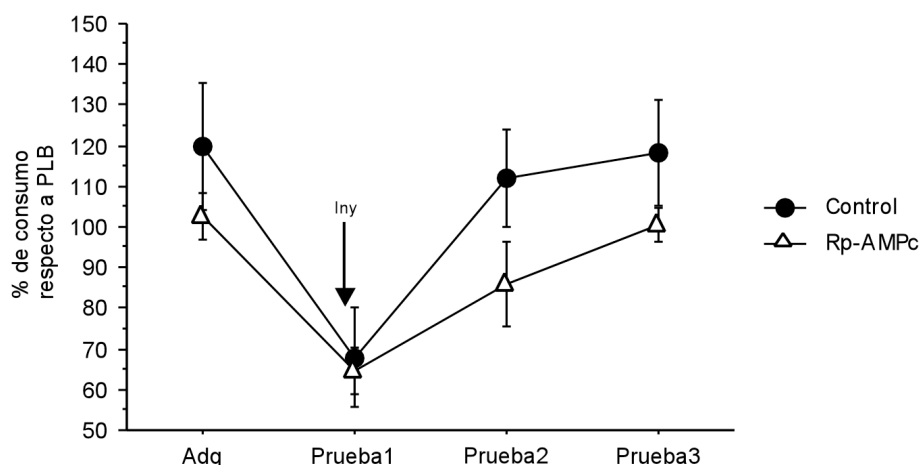


Figura 15. Consumo de sacarina en la evocación como porcentaje relativo al consumo de agua durante la línea basal en animales inyectados 15 minutos antes de la Prueba 1 con Solución salina ( $n=3$ ) y en animales inyectados 15 minutos antes de la Prueba 1 con Rp-AMPC  $9 \mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}$  ( $n=4$ ). Se muestra la media  $\pm$  ES \* $p<0.05$  Prueba 1 vs Adq \* $p<0.05$  Prueba 1 vs Prueba 2 y # $p<0.05$  Prueba 1 vs Prueba 3.

## **DISCUSIÓN.**

Los receptores NMDA están ampliamente involucrados en diferentes procesos del SNC por lo cual es necesario estudiar los mecanismos que regulan la actividad de estos receptores. La fosforilación al ser un mecanismo celular rápido, reversible y que puede resultar en cambios a largo plazo en la función del receptores el principal candidato a estar regulando la actividad de este canal.

En el presente trabajo se ha tratado de comprender la participación de la fosforilación de la subunidad NR1 en los procesos de consolidación y evocación del condicionamiento aversivo al sabor.

## **FOSFORILACIÓN DE NR1 DURANTE LA POST-ADQUISICIÓN.**

Una vez que se han presentado el estímulo condicionado e incondicionado para establecer el condicionamiento aversivo al sabor ocurren varios procesos celulares para consolidar dicha tarea. Se ha propuesto que además de las señales que se encargan de codificar cada uno de los estímulos, es necesario que exista una reactivación de las estructuras que fueron inicialmente involucradas en la adquisición de esta tarea. Hasta ahora, se ha reportado una liberación conjunta de dopamina y glutamato en la CI (Guzmán-Ramos et al., 2010) así como de noradrenalina y glutamato en la amígdala (Guzmán-Ramos et al., 2012) durante la post-adquisición del CAS, dichas señales han sido postuladas como las encargadas de la consolidación del CAS.

Hoy es bien sabido que el sistema noradrenérgico mediante sus receptores  $\beta$ -adrenérgicos y el dopaminérgico, a través de los receptores D1 se encuentran acoplados a proteínas G que estimulan al AC, incrementando el nivel de AMPc y teniendo como resultado la activación de PKA, lo que conlleva a las fosforilación de varias proteínas incluyendo CREB, ocasionando la expresión de varios genes (Mayford et al., 1995). Por otra parte, la activación de los receptores NMDA permite la entrada de  $Ca^{2+}$ , el actúa como segundo mensajero a través de la CaMKII. La cinasa CaMKII fosforila a los receptores AMPA, aumentando más la entrada de  $Ca^{2+}$  y a CREB, estimulando de nueva cuenta la expresión de

genes y la subsecuente síntesis proteica (Miyamoto, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la PKA fosforila la subunidad NR1 de los receptores NMDA (Bird et al., 2005) y a DARP-32 la cual inhibe la desfosforilación de NR1 (Snyder et al., 1998). La fosforilación de la subunidad NR1 incrementa el paso de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Raman et al., 1996) y la subsecuente activación de CaMKII para iniciar los procesos de transcripción y traducción en la sinapsis que a la larga modificaran la configuración de la misma (Dudai, 2002).

Además del incremento en el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor NMDA cuando este se encuentra fosforilado, se ha reportado que la formación de sinapsis excitatorias requiere del acoplamiento de receptores NMDA en la membrana celular. Inicialmente, los receptores NMDA recién sintetizados deben ensamblarse, madurar y ser transportados a través de la vía Retículo endoplásmico - Golgi (Scott et al., 2001). Las modificaciones en el número de receptores en la membrana post-sináptica son mecanismos clave en el fortalecimiento sináptico. Asimismo, el aprendizaje ocasiona una translocación de receptores NMDA en la membrana (Delint-Rámirez et al., 2008)

La fosforilación de los receptores NMDA es uno de los mecanismos que pueden regular el tráfico de receptores. El carboxilo terminal de la subunidad NR1 contiene tres serinas (890, 896, 897) que al estar fosforiladas regulan dicho tráfico. La fosforilación de la serina 890 por PKC y de la 897 por PKA incrementa el número de subunidades NR1 en la superficie de la membrana (Crump et al., 2001).

Existe otra forma de interacción entre la PKA y los receptores NMDA que podría ayudar a explicar cómo es que estas señales participan en el proceso de consolidación, este mecanismo propuesto es a través del incremento en la liberación de glutamato en las terminales presinápticas (Herrero y Sánchez-Prieto, 1996; Huang et al., 1996; Huang y Hsu, 2006). La activación de PKA en la terminal presináptica ocasiona un incremento en la fosforilación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje permitiendo una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la terminal presináptica lo cual se ha relacionado fuertemente con un incremento en la

unión de vesículas sinápticas con la membrana celular, aumentando la liberación del neurotransmisor glutamato hacia el espacio sináptico (Pigino et al., 2006).

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que la subunidad NR1 se fosforila en la serina 897 en el intervalo de tiempo donde estaría ocurriendo la consolidación del CAS en la CI y en la amígdala. Este evento podría generar un mayor flujo de  $Ca^{2+}$ , para iniciar la síntesis de proteínas, además del incremento en la inserción de receptores NMDA en las terminales post - sinápticas, teniendo como resultado una modificación en la estructura de la sinapsis y un fortalecimiento del trazo mnémico.

### **MICRODIÁLISIS EN LIBRE MOVIMIENTO DURANTE LA EVOCACIÓN DEL CAS.**

Se desconoce mucho sobre los mecanismos partícipes en el acto de recordar, hasta ahora se sabe que el glutamato está involucrado en la evocación de tareas aversivas (Tucci et al., 1998) y el presente trabajo coincide con esos resultados al observar un incremento en la liberación de glutamato en la amígdala y en la CI durante la evocación del CAS. No obstante, este incremento de glutamato observado en la expresión de conductas aversivas actúa principalmente sobre los receptores AMPA (Walker y Davis, 2002; Yasoshima et al., 2005) y no así en los NMDA, kainato o metabotrópicos.

En el caso de la dopamina, el presente trabajo reportó incrementos en los niveles extracelulares tanto en la presentación del estímulo novedoso como en un estímulo previamente condicionado. Hasta ahora se sabe que la dopamina está relacionada con la novedad de los estímulos (Guzmán-Ramos et al., 2010) y en el caso de la evocación se ha reportado la participación de los receptores D2 en la expresión del condicionamiento al miedo (de Oliveira et al., 2008).

La respuesta dopaminérgica en la CI incrementa cuando se presenta un estímulo gustativo novedoso; se ha observado que en estructuras que reciben aferencias dopaminérgicas existe un incremento en los niveles de dopamina ante la exposición a

estímulos nuevos (Feenstra, et al., 2002; De Leonibus et al, 2006; Rossetti y Carboni, 2006). En el caso de la sacarina familiar no aversiva se registró un cambio en los niveles extracelulares de dopamina; esto contrasta con datos que proponen que la dopamina no interviene en la evocación de estímulos familiares y únicamente participa en la consolidación de estímulos novedosos (Berman et al., 2000); sin embargo el incremento reportado aquí es menor al observado en la sacarina novedosa sugiriendo que a medida que el sabor se vuelve familiar, el estímulo se vuelve menos relevante para el organismo.

Cuando la sacarina ha adquirido el valor de aversiva existe un incremento en la amígdala y CI de dopamina ante la presentación de este estímulo. Se sabe que la dopamina es uno de los neurotransmisores moduladores más potentes que subyacen estados de miedo y ansiedad (Pezze y Feldon, 2004). Asimismo se ha descrito la liberación de dopamina en la amígdala en diferentes tareas donde se somete al organismo a estrés (Yokoyama et al., 2005; Inglis y Moghaddam, 1999). Sin embargo, no se ha podido determinar si la dopamina participa como ansiogénico o ansiolítico y únicamente se dilucidado que facilita al organismo a enfrentarse de mejor forma al ambiente estresante (Pérez de la Mora et al., 2009).

En este trabajo se observó un incremento en los niveles de noradrenalina en la CI y en la amígdala durante la exposición a un estímulo gustativo novedoso a uno previamente asociado con malestar gástrico. En el caso del sabor novedoso, se ha demostrado que la inyección de noradrenalina en la amígdala incrementa la preferencia por un sabor familiar sobre uno novedoso (Borsini y Rolls, 1984). Los estímulos novedosos representan claves relevantes para la modulación de la asociación entre los estímulos y las consecuencias, es decir la noradrenalina estaría relacionada con la saliencia del estímulo novedoso. Por otra parte, durante la evocación del CAS la liberación de noradrenalina se puede deber a lo estresante que puede ser para el organismo evocar una tarea aversiva, ya que los agentes estresantes como la novedad, el dolor o la restricción ocasionan aumentos en los niveles extracelulares de noradrenalina (McGaugh y Roozendaal, 2002; Morilak et al., 2005; Tanaka et al., 1991). En el caso del CAS la evocación de un estímulo asociado con malestar gástrico podría estar generando estrés y esto se ve reflejado en los cambios en la liberación de noradrenalina en la CI y en la amígdala.

Las catecolaminas y su relación con la actividad de PKA podría estar modulando la liberación de glutamato en la evocación, este fenómeno podría ser similar al que ocurre en el proceso de consolidación y que fue descrito previamente.

### **CURVA TEMPORAL PNR1 POST-EVOCACIÓN.**

Este trabajo mostró que 15 minutos después de la evocación existe un incremento en la fosforilación de la subunidad NR1 en la CI y que esta decae con el tiempo; en el caso de la amígdala no existen cambios. A pesar de que no es necesaria la participación de la subunidad NR1 para la evocación del CAS en la corteza (Cui, et al., 2004), se ha descrito que otro proceso mnémico llamado extinción es dependiente de la CI (García de la Torre et al., 2010); por lo cual es probable que estos cambios en la fosforilación de NR estén relacionados con este proceso, sin embargo se requiere de manipular la actividad de PKA para demostrar esto. Por otro lado la ausencia de cambios en la fosforilación de NR1 en la amígdala se debe a que la evocación de las memorias aversivas depende de los receptores AMP, (Yasoshima et al. 2005).

Por lo cual se sugiere que la fosforilación de NR1 en la CI no es necesaria para la evocación, pero probablemente participe en el proceso de extinción.

### **BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE PKA DURANTE LA EVOCACIÓN**

El experimento fue similar al trabajo hecho por Koh y Bernstein (2003), sin embargo se obtuvieron resultados diferentes. Ellos registraron que la inyección de un antagonista de PKA en la amígdala basolateral antes de la primera evocación logra mejorar la extinción de la tarea, es decir los sujetos muestran una extinción más rápida. En este trabajo la inyección empeoró la extinción de la tarea, los sujetos mostraron una extinción más lenta; aunque la conducta de CAS fue medida de diferente forma, en el caso de Koh y Bernstein utilizaron como medida el tiempo que la rata tardaba en dejar caer el líquido, en este trabajo se utilizó el consumo como medida. Esto dificulta la explicación de estos resultados ya que uno de los motivos iniciales de este trabajo era la poca literatura que existe sobre la actividad de PKA en

estos procesos.

## CONCLUSIONES

En resumen este trabajo fortalece la idea de que en el proceso de consolidación del CAS requiere de una sinergia entre el sistema glutamatérgico y catecolaminérgico y que está regulada por la fosforilación de la subunidad NR1 en la CI y en la amígdala.

En la evocación, el glutamato estaría encargado de dar la señal de aversión en un animal condicionado y que se encontraría modulado por la actividad de la noradrenalina y la dopamina. Además la fosforilación de NR1 en la CI durante en un período posterior a la evocación estaría participando en el proceso de extinción.

## REFERENCIAS

- Abel, T., Nguyen, P.V., Barad, M., Deuel, T.A., Kandel, E.R., & Bourtchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 88(5):615-26.
- Acolla, R., Bathellier, B., Petersen, C.H. & Carleton, A. (2007). Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *The journal of Neuroscience*. 27 (6): 1396 – 1404.
- Aggleton, J.P., Petrides, M., & Iversen, S.D. (1981). Differential effects of amygdaloid lesions on conditioned taste aversion learning by rats. *Physiology and Behavior*. 27: 397 – 400.
- Alheid, G.F., Olmos, J.S., & Beltramino, C.A. (1995). Amygdala and extended amygdala. En Paxinos, G. *The rat nervous system*. 2nd ed. Academic Press. San Diego.
- Anderson, J.R. (2001). *Aprendizaje y memoria*. McGraw – Hill. México.
- Bauman, A.L., Goehring, A.S., & Scott, J.D. (2004). Orchestration of synaptic plasticity through AKAP signaling complexes. *Neuropharmacology*. 46(3):299-310.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Neduva, V., & Dudai Y. (2000) The Role of Identified Neurotransmitter Systems in the Response of Insular Cortex to Unfamiliar Taste: Activation of ERK1–2 and Formation of a Memory Trace. *Journal of Neuroscience* 20(18):7017-7023
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste – recognition memory. *Nature Reviews. Neuroscience*. 5: 209 – 217.
- Bermudez-Rattoni F., & McGaugh J.L. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research*. 549(1):165-170.
- Bermúdez-Rattoni, F., & Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: lesions studies En Bures, J., Bermúdez – Rattoni, F., & Yamamoto, T. *Conditioned taste aversión. Memory of a special kind*. Oxford University Press. New York.
- Bermúdez-Rattoni, F., Quirarte, G.L. & Prado - Alcalá, R.A. (2001). Pavlov y sus perros. En Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, R. A. *Memoria: dónde reside y cómo se forma*. Trillas. México.

- Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I., & Medina, J.H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci.* 94(13):7041-6.
- Borsini, F., & Rolls, E.T. (1984). Role of noradrenaline and serotonin in the basolateral region of the amygdala in food preferences and learned taste aversions in the rat. *Physiology and Behavior.* 33: 37 – 43.
- Bures, J. (1998a). Ethology, physiological psychology, and neurobiology of CTA. En Bures, J., Bermúdez – Rattóni, F., & Yamamoto, T. *Conditioned taste aversión. Memory of a special kind.* Oxford University Press. New York.
- Bures, J. (1998b). The CTA paradigm: terminology, methods, and conventions. En Bures, J., Bermúdez – Rattóni, F., & Yamamoto, T. *Conditioned taste aversión. Memory of a special kind.* Oxford University Press. New York.
- Bird, G.C., Leanne, L., Han, J.S., Zou, X., Willis, W.D., & Neugebauer, V. (2005). Protein kinase A – dependent enhanced NMDA receptor function in pain – related synaptic plasticity in rat amygdala neurons. *Journal of Physiology.* 564(3): 907 – 921.
- Carlson, N.R. (2007). *Physiology of behavior.* 9th ed. Pearson – Allyn and Bacon. Boston.
- Cammarota, M., Barros, D.M., Vianna, M.R., Bevilaqua, L.R., Coitinho, A., Szapiro, G., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., & Izquierdo, I. (2004). The transition from memory retrieval to extinction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 76 (3): 573 – 582.
- Crump, F.T., Dillman, K.S. and Craig, A.M. (2001) cAMP- Dependent protein kinase mediates activity regulated synaptic targetin of NMDA receptors. *The journal of Neuroscience.* 21(14) 5079-5088.
- Cubero, I., Thiele, T.E., & Bernstein, I.L. (1999). Insular cortex lesions and taste aversion learning: effects of conditioning method and timing of lesion. *Brain Research.* 839(2): 323-330.
- Cui, Z., Wang, H., Tan, Y., Zaia, K.A., Zhang, S., and Tsien, J.Z. (2004). Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptro in preserving remote memories in the brain. *Neuron.* 41. 781-793.
- Dell'Acqua, M.L., Smith, K.E., Gorski, J.A., Horne, E.A., Gibson, E.S., & Gomez LL. (2006). Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics. *Eur J Cell Biol*85(7):627-33
- Delint-Rámirez, I., Salcedo-Tello, P., Bermúdez-Rattoni, F. (2008) Spatial formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 tu synaptic lipid rafts. *Journal of Neurochemistry* 106 1658-1668.
- De Leonibus, E., Verheij, M. M., Mele, A. and Cools, A. (2006) Distinct kinds of novelty processing differentially increase extracellular dopamine in different brain regions. *The European journal of neuroscience,* 23, 1332-1340.
- Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends.* Oxford University Press. New York.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long – term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology.* 12: 211 – 216.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, How stable is the engram? *Annual Reviews of Psychology.* 55: 51-86.
- Eisenberg, M., Kobilo, T., Berman, D.E., & Dudai, Y. (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science.* 301(5636):1102-4
- Fernández, J., & Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Clasificación de la memoria. En Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, R. A. *Memoria: dónde reside y cómo se forma.* Trillas. México.
- Fernández, J., & Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Clasificación de la memoria. En Bermúdez-Rattoni, F y Prado-Alcalá, R. A. *Memoria: dónde reside y cómo se forma.* Trillas. México.
- Feenstra, M. G., Teske, G., Botterblom, M. H. and De Bruin, J. P. (1999) Dopamine and noradrenaline release in the prefrontal cortex of rats during classical aversive and appetitive conditioning to a contextual stimulus: interference by novelty effects. *Neuroscience letters,* 272, 179-182.
- Fitzgerald, R.E., & Burton, M.J. (1983). Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. *Physiology and Behavior.* 30: 203 – 206.



- Flexner, L.B., Flexner, J.B., Roberts, R.B. & De la Haba, G. (1964). Loss of recent memory in mice as related to regional inhibition of cerebral protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science*. 52: 1165 – 1169.
- Flint, R.W. & Marino, C.L. (2007). Cycloheximide impairs reconsolidation of a contextually reactivated memory in a conditioned taste aversion paradigm. *Behavioral Neuroscience*. 121(2): 433-438
- Gallo, M. Roldan, G., & Bures, J. (1992). Differential involvement of gustatory cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research*. 52: 91 – 97.
- Garcia, J., Kimeldorf, D.J., and Koelling, R.A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*. 122: 157 – 158.
- García-DeLaTorre, P., Rodríguez-Ortiz, C.J., Arreguin-Martínez, J.L., Cruz-Castañeda, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2009). Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learning & Memory*. 16(9): 514-519.
- Gold, P.E. (2008). Protein synthesis inhibition and memory: formation vs amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*. 89(3): 201-211.
- Gordon, W.C. (1977). Similarities of recently acquired and reactivated memories in interference. *American Journal of Psychology*. 90(2): 231-242.
- Gruest, N., Richer, P., & Hars, B. (2004). Memory consolidation and reconsolidation in the rat pup require protein synthesis. *Journal of Neuroscience*. 24(46): 10488-10492.
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2010) Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of Neurochemistry*. 114:226-236
- Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2012) Pos-acquisition release of glutamate and norepinephrine in the amygdala is involved in taste-memory consolidation 19:231-238
- Huang, C., Hsu, K., & Gean, P. (1996). Isoproterenol potentiates synaptic transmission primarily by enhancing presynaptic calcium influx via P – and/or G – type calcium channels in the rat amygdala. *The Journal of Neuroscience*. 16(3): 1026 – 1033.
- Huang, C., Lin, C., & Gean, P. (1998). Potentiation of N-methyl-D-aspartate currents by isoproterenol in the acutely dissociated rat amygdalar neurons. *Neuroscience Letters*. 253: 9 – 12.
- Hupbach, A., Gomez, R., Hardt, O., & Nadel, L. (2007). Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learning & Memory*. 14(1-2):47-53
- Inglis, F.M., & Moghaddam, B. (1999). Dopaminergic innervations of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry*. 72: 1088 – 1094.
- Kandel, E.R., Kupfermann, I., & Iversen, S. (2000). Learning and memory. En Kandel, E.R., Schwartz, J.H., y Jessell, T.M. *Principles of neural science*. 4th ed. McGraw Hill. New York.
- Kalev-Zylinska, M.L., Symes, W., Young, D. and During, M.J. (2009). Knockdown and overexpression of NR1 modulates NMDA receptor function. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 41. 383-296.
- Kemenes, G., Kemenes, I., Michel, M., Papp, A., & Müller, U. (2006). Phase-dependent molecular requirements for memory reconsolidation: differential roles for protein synthesis and protein kinase A activity. *Journal of Neuroscience*. 26(23): 6298-6302.
- Kesner, R.P., Berman, R.F., & Tardif, R. (1992). Place and taste aversion learning: Role of basal forebrain, parietal cortex, and amygdala. *Brain Research Bulletin*. 29: 345 – 353.
- Kolb, B., Nonneman, A.J., & Abplanalp. (1977). Studies on the neural mechanisms of bait-shyness in rats. En Fitzgerald, R.E., and Burton, M.J. Neophobia and conditioned taste aversion deficits in the rat produced by undercutting temporal cortex. *Physiology and Behavior*. 30: 203 – 206.
- Koh, M.T. & Bernstein, I.L. (2003). Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport*. 14(3): 405-407
- Koh, M.T., Thiele, T.E., & Bernstein, I.L. (2002). Inhibition of protein kinase A activity interferes with long-term, but not short-term, memory of conditioned taste aversions. *Behavioral Neuroscience*. 116(6): 1070-1074.
- Kosar E., Grill, H.J., & Norgren R. (1986). Gustatory cortex in the rat. I. Physiological properties and

cytoarchitecture. *Brain Research*. 379(2): 329-341

Laube, B., Kuhse, J., and Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience* 18(8) 2954-2961

Lee, J.L. (2009). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*. 11(11): 1264-1266.

Lee, J.L. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in neurosciences*. 32(8): 413-420.

Lewis, D.J. (1979) Psychobiology of active and inactive memory. En Nader, K. & Einarsson, E.Ö. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1191: 27-41.

Mazur, J.E. (2006). *Learning and behavior*. 6th. ed., Pearson - Prentice Hall. New Jersey.

McGaugh, J.L. and Roozendaal, B. (2002) role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology* 12. 205-210.

Milekic, M.H., & Alberini, C.M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*. 36(3):521-5.

Misanin, J.R., Miller, R.R., & Lewis, D.J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*. 160(827): 554-555.

Miyamoto, E. (2006). Molecular mechanisms of neuronal plasticity: Induction and maintenance of Long – Term Potentiation in the hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*. 100: 443 – 442.

Morilak, D.A., Barrera, D., Echevarria, D.J., Garcia, A.S., Hernández, A., Ma, S., & Petre, C.O. (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 29:1214 -1224.

Nader, K., & Hardt, O. (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature reviews. Neuroscience*. 10(3): 224-234.

Nader, K., Schafe, G.E., & Le Doux, J.E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 406(6797): 722-726.

Nader, K. & Einarsson, E.Ö. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1191: 27-41.

Nerad, L., Ramírez-Amaya, V., Ormsby, C.E., & Bermúdez-Rattoni F. (1996). Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiology of learning and memory*. 66(1): 44-50

Nguyen, P.V., & Kandel, E.R. (1996). A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *Journal of neuroscience*. 16(10):3189-98.

Pedreira, M.E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*. 38(6):863-9.

Pérez de la Mora, M., Gallegos – Cari, A., Arizmendi – García, Y., Marcellino, D., and Fuxe, K. (2009). Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*. 985: article in press.

Pigino, G., Morfini, G., & Brady, S.T. (2006). Intracellular trafficking. En Siegel, G.J. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. 7th ed. Elsevier Academic Press. Amsterdam.

Pitkänen, A., Jolkkonen, E., & Kempainen, S. (2000). Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphology* 59 (1): 1 – 23.

Prado - Alcalá, R., & Quirarte, G. (2007). La consolidación de la memoria, un siglo después. *Revisión en Neurociencia*. 45: 284 - 292.

Raman, I.M., Tong, G., & Jahr, C.E. (1996).  $\beta$  – adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP – dependent protein kinase. *Neuron*. 16: 415 – 421.

Reilly, S. (1999). The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Research bulletin*. 48(3): 239 – 254.

- Raymond, L.A., Tingley, W.G., Blackstone, C.D., Roche, K.W., and Huganir, R.L. (1994). Glutamate receptor modulation by protein phosphorylation. *Journal of Physiology* 88: 181-192.
- Roberts, W.A. (1998). *Principles of animal cognition*. McGraw – Hill. New York.
- Rossetti, Z. L. and Carboni, S. (2005) Noradrenaline and dopamine elevations in the rat prefrontal cortex in spatial working memory. *J Neurosci*, 25, 2322-2329.
- Squire, L.R. (1987) *Memory and brain*. Oxford University Press. New York
- Rodriguez-Ortiz, C.J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R., & Bermudez-Rattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning & Memory*. 12(5): 533-537.
- Sah, P, Faber, E.S., López de Armentia, M. & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews*. 83: 803 – 834.
- Sanchez, H., Quinn, J.J., Torregrossa, M.M., & Taylor JR. (2010). Reconsolidation of a Cocaine-Associated Stimulus Requires Amygdalar Protein Kinase A. *Journal of Neuroscience*. 30(12): 4401-4407
- Sara, S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*. 7: 73 – 84
- Schafe, G.E., & Bernstein, I.L. (1983). Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: I. The amygdala. *Brain Research*. 741: 109 -116.
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swansons, G.T., Zhang, C., and Ehlers, M.D. (2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *The Journal of Neuroscience* 21(9) 3063-3072
- Skalhegg, B.S. & Taskén, K. (1997). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation and subcellular localization of PKA. *Frontiers in bioscience*. 331-342.
- Snyder, G.L., Fienberg, A.E., Huganir, R.L., and Greengard, P. (1998). A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/ dopamine – and – cAMP – regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase – 1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *The Journal of Neuroscience*. 18(24): 10297 – 10303.
- Stehberg, J., Levy, D., & Zangen A. (2009). Impairment of aversive memory reconsolidation by localized intracranial electrical stimulation. *Eur J Neurosci*. 29(5):964-9.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., & Kida, S.(2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci*. 24(20):4787-95.
- Tanaka, T, Yokoo, H., Mizoguchi, K., Yoshida, M., Tsuda, A., and Tanaka, M. (1991) Noradrenaline release in the rat amygdala is increased by stress: studies with intracerebra microdialysis. *Brain Research*. 554: 174-176
- Taskén, K., & Aandahl, E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiology Reviews*. 84(1): 137-167
- Tingley, W.G., Ehlers, M.D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J.B., Riley, C.T., and Huganir, R.L. (1996). Characterization of Protein Kinase A and Protein Kinase C phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *The Journal of Biological Chemistry* 272(8) 5157-5166.
- Tronson, N.C., Wiseman, S.L., Olausson, P., & Taylor, J.R. (2006). Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nature Neuroscience*. 9(2): 167-169.
- Tucci, S., Rada, P., and Hernandez, L. (1998) Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain research*. 813: 44- 49.
- Tulving, E. (2000). Introduction. En Gazzaniga, M.S. *The new cognitive neurosciences*. 2nd ed. MIT Press, Massachusetts.
- Walker, D.L., and Davis, M. (2002) The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear potentiated startle, and extinction. *Pharmacology Biochemistry and behavior*. 71 379-392
- Welzl, H., D'Adamo, P., & Lipp, H.P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioral Brain Research*. 125: 205 – 213.
- Yamamoto, T., Noritaka, S., Sakai, N., & lwafune, A. (1997). Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the

rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. *Neuroscience letters*. 226: 127 – 130.

Yamamoto, T., Tsuyoshi, S., Noritaka, S., Yasunobu, Y., & Nobuyuki, S. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral Brain Research*. 65: 123 – 137.

Yasoshima, Y., Yamamoto T., and Kobayashi K., (2005) Amygdala-dependent mechanisms underlying memory retrieval of conditioned taste aversion. *Chemical Senses* 30(1)

Yokoyama, M., Susuki, E., Sato, T., Maruta, S., Watanabe, S., & Miyaoka, H. (2005) Amygdala levels of dopamine and serotonin rise upon exposure to conditioned fear stress without elevation of glutamate. *Neuroscience letters*. 379: 37-41

Zhao, W.Q., Polya, G.M., Wang, B.H., Gibbs, M.E., Sedman, G.L., & Ng, K.T. (1995). Inhibitors of cAMP-dependent protein kinase impair long-term memory formation in day-old chicks. *Neurobiology of learning and memory*. 64(2): 106-118.