



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**“EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN  
EL HIPOCAMPO DORSAL SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE  
LA MEMORIA DE UN APRENDIZAJE  
INCREMENTADO”**

**T E S I S**

---

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

Nombre de la sustentante: LBM. MARÍA EVELINA TORRES GARCÍA

**DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

---

Los miembros del Comité Tutoral certificamos que la tesis elaborada por: María Evelina Torres García, cuyo título es: “Efecto de la inhibición de la transcripción en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **Presidente**

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez

### **Secretario (Tutor)**

Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

### **Vocal**

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

### **Suplente**

Dra. María Magdalena Giordano Noyola

### **Suplente**

Dr. José Fernando Peña Ortega

Aprobado por el Comité Académico

---

Coordinador del Programa

## RESUMEN

---

Se ha postulado que el proceso de consolidación de la memoria es dependiente de la síntesis de ARNm. Al administrar intracerebralmente inhibidores de esta síntesis, se produce un efecto amnésico. No se sabe si este efecto producido por inhibidores de la transcripción se presenta cuando los sujetos son sometidos a condiciones de sobrerreforzamiento. El objetivo fue determinar si la administración de 5,6-Dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB), un inhibidor de la transcripción, en el hipocampo dorsal produce amnesia en ratas entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria (EI) con intensidad baja o alta de reforzamiento. En ratas macho (Wistar, 250-350 g), se implantaron bilateralmente cánulas en el hipocampo dorsal. Después, fueron entrenadas en una tarea de EI. Se administró DRB (20, 40 u 80 ng) 15 minutos antes del entrenamiento usando un choque eléctrico de 1mA. En otros grupos se administró DRB (80 ng) usando un choque de 1 ó 2 mA. Otros grupos recibieron DRB (80 ng) antes del entrenamiento y antes de la prueba, usando un choque eléctrico de 1 mA. En todos los casos la prueba de retención se realizó 48 h después del entrenamiento.

En todas las condiciones hubo un grupo de ratas tratadas con vehículo. El DRB produjo amnesia con dosis de 40 y 80 ng cuando se aplicó un choque eléctrico de 1 mA. Pero cuando las ratas fueron entrenadas con el choque eléctrico alto, el efecto amnésico no se presentó. No se observó dependencia de estado. Concluimos que en condiciones de sobrerreforzamiento la síntesis de ARNm en el hipocampo dorsal no es necesaria para la formación de la memoria de largo plazo.

## SUMMARY

---

Memory consolidation is the process by which newly learned information is stabilized into long-term memory. The finding that interference with transcription in cerebral structures that are involved in memory consolidation, such as the dorsal hippocampus (DH), produces memory deficiencies, has led to the suggestion that this process requires de novo RNA synthesis. On the other hand, it has been demonstrated over-training protects against the amnesic effects of several treatments that interfere with cerebral activity, including protein synthesis inhibitors. The objective of the present work was to determine whether enhanced inhibitory avoidance (IA) training also has a protective effect in rats treated with the mRNA synthesis blocker 5,6-dichloro-1- $\beta$ -d-ribofuranosyl benzimidazole (DRB) in the DH. Independent groups of rats were trained in IA using two different intensities of foot-shock (1.0 and 2.0mA). DRB (80 ng/0.5  $\mu$ L) or its vehicle, dimetil sulfoxide (DMSO), was administered bilaterally 15 min before the training session. Forty-eight hours later, their retention latencies were measured. Our results showed that pre-training DRB administration produced amnesia in the 1.0 group while no alterations in memory consolidation were produced the group that had been trained with 2.0 mA. These data suggest that in an enhanced learning of an IA training (high foot-shock group) mRNA synthesis is not required for memory consolidation at least in DH.

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero expresar mi reconocimiento y agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, por el apoyo que me brindaron para la realización de la presente tesis:

La realización de la presente tesis fue posible gracias a la ayuda, apoyo y aportaciones de las siguientes personas y dependencias a las cuales deseo expresarles mis más sinceros agradecimientos.

- Al Dr. Roberto A. Prado Alcalá, por permitirme seguir aprendiendo al darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo. Por su paciencia, sus consejos y su guía a lo largo de la realización de este proyecto.

- A la Dra. A. Cristina Medina Fregoso, por el tiempo brindado y su gran ayuda en el procesamiento de datos, sus aportaciones e ideas.

A la M. V. Z. Norma Serafín López, por valiosa ayuda a lo largo del experimento y por la paciencia durante mi integración a laboratorio.

- Al comité revisor formado por la el Dr. Roberto A. Prado Alcalá, la Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez, a el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, a la Dra. María Magdalena Giordano Noyola y el Dr. Fernando Peña Ortega, por sus valiosas correcciones que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

- Al Sr. Ángel Méndez, por el cuidado de los animales.

- Laboratorio de Aprendizaje y Memoria. Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva. Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México.

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología Campus UNAM-Juriquilla:

- Bioterio: M. V. Z. José Martín García

- Cómputo: Ingenieros Ramón Martínez, Alberto Lara y Omar González

- Enseñanza: Mtra. Leonor Casanova

- Biblioteca: Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero por la beca de licenciatura y por el donativo de investigación (Proyecto 128259).

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal

## ÍNDICE

---

RESUMEN.....	ii
SUMMARY .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	iv
1. INTRODUCCIÓN: ASPECTOS GENERALES .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. MEMORIA DE CORTO PLAZO Y MEMORIA DE LARGO PLAZO.....	3
2.2. TEORÍA DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA .....	5
2.3. SÍNTESIS DE ARN MENSAJERO Y CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA .....	6
2.6.1. DRB Y SU ACCIÓN SOBRE LA SÍNTESIS DE ARNm .....	8
2.4. HIPOCAMPO Y SU FUNCIÓN EN LA MEMORIA .....	8
2.5. EFECTO PROTECTOR DEL APRENDIZAJE INCREMENTADO .....	11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
3.1. HIPOTESIS .....	14
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	14
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
4.1. SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN .....	15
4.2. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA .....	15
4.3. EVITACIÓN INHIBITORIA (EI).....	16
4.3.1. APARATOS.....	16
4.4. PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES .....	17
4.4.1. MANIPULACIÓN.....	17
4.4.2. ENTRENAMIENTO .....	17
4.4.3. PRUEBA DE RETENCIÓN .....	17

4.5. ADMINISTRACION DE DRB.....	18
4.6. EXPERIMENTOS.....	18
4.6.1. EXPERIMENTO 1: CURVA DOSIS RESPUESTA .....	18
4.6.2. EXPERIMENTO 2: CURVA DE INTENSIDADES.....	19
4.6.3. EXPERIMENTO 3: DEPENDENCIA DE ESTADO .....	19
4.6.4. EXPERIMENTO 4: MEMORIA DE CORTO PLAZO .....	20
4.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO .....	21
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	21
5. RESULTADOS .....	22
5.1. CURVA DOSIS RESPUESTA.....	22
5.2. CURVA DE INTENSIDADES .....	23
5.3. MEMORIA DE CORTO PLAZO (MCP) .....	25
5.4. DEPENDENCIA DE ESTADO.....	26
5.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO .....	27
6. DISCUSIÓN.....	28
7. CONCLUSIONES .....	33
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
9. ÍNDICE DE FIGURAS.....	44

## 1. INTRODUCCIÓN: ASPECTOS GENERALES

---

Tanto el aprendizaje como la memoria son fenómenos involucrados en el procesamiento de la información sensorial que se relacionan de manera interdependiente y que juegan un papel muy importante en la adaptación y sobrevivencia de los organismos.

El aprendizaje es un proceso continuo que se define como la modificación de las respuestas conductuales que se dan de manera más o menos permanente y que se producen a partir de la experiencia (Morgado, 2005). La memoria ha sido descrita como el fenómeno por el cual se retiene o almacena la información adquirida, la cual puede ser recuperada a lo largo del tiempo (Kandel, 2001). En 1900, Müller y Pilzecker propusieron que la formación de una memoria permanente toma tiempo y que es durante este tiempo cuando se puede interferir con el almacenamiento de la información (McGaugh, 1966; Muller y Pilzecker, 1900). El proceso requerido para el desarrollo de una memoria estable es conocido como consolidación.

Existe una amplia evidencia, desarrollada en los últimos 50 años, que ha mostrado muchos de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el proceso de consolidación y de la formación de una memoria duradera (Kandel, 2001; McGaugh, 1966, 2000). Uno de los principales mecanismos celulares que se ha pensado es requerido para la formación de la memoria es la síntesis de proteínas y de ARNm; la dependencia de estos procesos ha permitido dividir a la memoria en dos fases, la memoria de corto plazo (de minutos a pocas horas) y la memoria de largo plazo (de horas, días semanas o inclusive años), siendo la última dependiente de los mecanismos antes mencionados (Davis y Squire, 1984; Emptage y Carew, 1993; Izquierdo et al., 1998; McGaugh, 1966, 2000).

Puesto que todo acto conductual es reflejo de la acción del sistema nervioso, cualquier cambio en la conducta será el reflejo de las modificaciones funcionales en este sistema, siendo ésta una de las cuestiones abordadas en los últimos años para entender las bases neurobiológicas del aprendizaje y la memoria. Como en muchos otros casos, en la presente investigación se decidió utilizar el modelo de evitación inhibitoria en rata,

este paradigma presenta varias ventajas una de ellas es que la tarea se adquiere en una sola sesión de entrenamiento de corta duración, reduciendo considerablemente la posibilidad de que los resultados experimentales se vean alterados por la intervención de factores ambientales aleatorios, además nos permite delimitar claramente entre los procesos de adquisición, la formación de la memoria de corto y la de largo plazo y la evocación.

Una de las estructuras que se ha demostrado que participa de manera crítica en la formación de la memoria es el hipocampo (Scoville y Milner, 1957), y su participación en la tarea de evitación inhibitoria ha sido ampliamente demostrada, ya que al interferir con su actividad se deteriora la retención de la misma (Izquierdo et al., 1992; Ambrogio-Lorenzini et al., 1996; Stublely-Weatherly et al., 1996; Martínez et al., 2002). Una de las principales funciones atribuidas al hipocampo es la de codificar rápidamente asociaciones de un estímulo complejo y almacenar la experiencia en la memoria (Morris y Frey, 1997), además se ha propuesto que muchos de los eventos moleculares requeridos para el trazado mnemónico ocurren en hipocampo (Bekinschtein et al., 2007; Miyashita et al., 2009; O' Sullivan, 2007).

En nuestro laboratorio se ha encontrado que bajo condiciones de entrenamiento de una experiencia incrementada de aprendizaje, es decir, una situación donde un individuo recibe un mayor número de sesiones de entrenamiento (sobrentrenamiento) o intensidades de estimulación relativamente altas (sobrerreforzamiento) bloquean el efecto de tratamientos experimentales que interfieren con el proceso de consolidación (Prado-Alcalá et al., 2007). El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la administración de un inhibidor de la síntesis de ARNm en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de una tarea de evitación inhibitoria (EI) en una situación de aprendizaje incrementado.

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1. MEMORIA DE CORTO PLAZO Y MEMORIA DE LARGO PLAZO

---

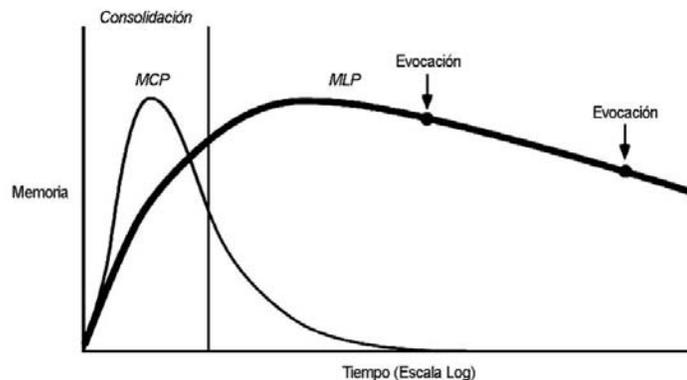
La memoria es un proceso activo y complejo que implica tres diferentes estadios: la *adquisición*, que ocurre cuando la nueva información ingresa para ser procesada y mantenida por un corto periodo; la *consolidación*, en esta fase la información, a través de la síntesis de proteínas y de ARNm, pasa de un estado lábil a uno estable y, por último, la *evocación*, que sucede cuando se recupera la información almacenada para poder ser utilizada cuando sea requerida. Estudios a nivel celular y molecular sugieren que estas fases pueden compartir mecanismos similares, y que su activación en el tiempo podría ser de forma secuencial o en paralelo (Lattal y Abel, 2001).

La información adquirida existe en una primera instancia en una forma lábil, la cual es susceptible a la interrupción, es la memoria de corto plazo (MCP); posteriormente se vuelve más estable y perdura en el tiempo en forma de memoria de largo plazo (MLP); esta estabilización de la memoria se da mediante el proceso hipotético de consolidación (Dudai, 2004).

Esta clasificación de la memoria en MCP y MLP se da en base a su temporalidad, la primera serie de experimentos que definieron algunos de los principios básicos sobre la memoria son los realizados por Ebbinghaus (1885) quien realizó el primer análisis sistemático de la memoria humana al intentar averiguar cuanta información novedosa podía almacenar un individuo y que tan rápido la olvidaba, Ebbinghaus diseñó un sistema de más de dos mil sílabas sin sentido para usarlo como material a memorizar, variando la longitud de las listas así como el número de repasos de cada una, para después analizar cuantas de estas sílabas era capaz de recordar al cabo del tiempo, observado que el número máximo de silabas que podía repetir tras un solo repaso de la lista dependía de el tiempo, anticipando así la división temporal de la memoria (Erdelyi, 2010). Posteriormente William James introdujo los conceptos de memoria primaria y memoria secundarias, refiriéndose a la MCP y la MLP, respectivamente (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998).

Existen dos modelos que describen la dependencia que podría existir entre la MCP y la MLP, uno de estos modelos propone que la información es transferida de la MCP a la MLP comúnmente a través de la repetición de la información recién adquirida, o bien, de acuerdo a la percepción del estímulo, es decir se plantea que el primer almacén es requerido para que la información pase al segundo almacén de mayor capacidad y duración (Atkinson y Shiffrin, 1971). Múltiples estudios han apoyado este modelo, pues han encontrado que la formación de la memoria después de la adquisición se puede irrumpir mediante la administración post-entrenamiento de diversos agentes farmacológicos de acción central y periférica, por ejemplo, los que actúan sobre receptores a los glucocorticoides (Sandi, 1998), adrenalina y noradrenalina (McGaugh et al., 1996), acetilcolina (Prado-Alcalá, 1985; Prado-Alcalá, Fernández-Ruiz y Quirarte, 1993), entre otros, así como inhibidores de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal (Lattal et al., 2004; Díaz-Trujillo et al., 2009).

El segundo modelo plantea que la MCP no necesariamente es siempre requerida para la formación de la MLP, ya que estudios experimentales que interfieren varios sistemas de neurotransmisión (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato y GABA), con la síntesis de proteínas y de ARNm, en estructuras como la corteza entorrinal y el hipocampo pueden afectar la MCP sin alterar la MLP en una tarea de EI (Da Silva et al., 2008; Igaz et al., 2002; Izquierdo et al., 1999), sugiriéndose que la MLP es procesada independiente y paralelamente a la MCP.



**Figura 1. Representación esquemática de la clasificación temporal de la memoria. MCP y MLP. Modificada de Dudai (2004).**

## 2.2. TEORÍA DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

---

La teoría de la consolidación de la memoria, se basó en el trabajo que Georg Müller y Alfons Pilzecker publicaron hace más de un siglo (Lechner et al., 1999; Prado-Alcalá y Quirarte, 2007). El término consolidación de la memoria se refiere al período de transición desde un estado fisiológico inicial lábil (MCP) hasta el establecimiento de una memoria duradera resistente a la interrupción (MLP) (Dudai, 2004). Durante este estadio se produce la actividad neural necesaria para fijar las asociaciones establecidas durante el aprendizaje. De acuerdo a McGaugh (2000) la consolidación de la memoria podría haber sido seleccionada por la evolución por su función adaptativa, ya que permite a los procesos endógenos activados por una experiencia determinada modular la intensidad del recuerdo de esa experiencia.

La duración del período de consolidación está en relación con el curso temporal que siguen los mecanismos celulares y moleculares subyacentes al mismo y en función de las interacciones entre los diferentes sistemas de memoria implicando de esta manera a la MCP y la MLP (Cahill y McGaugh, 1996) (Fig.1). Una MCP implica únicamente la activación de cascadas de transducción de señales, es decir, un proceso por el cual una célula transforma una señal extracelular en una respuesta intracelular y para que esta MCP de lugar a la MLP las señales de transducción deben llegar a el núcleo de la neurona, en donde se lleva a cabo el proceso de transcripción, y posteriormente la traducción del recién ARNm sintetizado, finalizando con la síntesis de proteínas *de novo*, las cuales son requeridas para remodelar las sinapsis, permitiendo de esta manera que la huella de la memoria sea más estable. A esto se le conoce con el nombre de consolidación sináptica (Debiec et al., 2002, Frankland y Bontempi, 2005). Hasta que esas asociaciones sean fijadas o consolidadas, la memoria es susceptible de ser interrumpida. Además se ha sugerido que este proceso de consolidación ocurre dentro de las primeras 6 horas posteriores a la experiencia en una tarea de evitación inhibitoria (EI), lo cual coincide con los cambios sinápticos observados en la misma tarea (O' Sullivan et al., 2007).

Sin embargo, algunos autores aún cuestionan el rol de la síntesis de proteínas y de ARNm *de novo* en la formación de la memoria. Una hipótesis alternativa propone que

la modificación post-traducciona de proteínas pre-existentes es necesaria y suficiente para la MLT, y que la transcripción y la traducción simplemente funcionan como mecanismos de reposición de proteínas usadas en las sinapsis (Routtenberg y Rekart 2005). Otra posibilidad que contemplan algunos autores, es que la síntesis de nuevas proteínas es importante para la modulación, pero no para la consolidación de la MLT, y no constituye el sustrato de la traza de memoria (Gold, 2006).

### **2.3. SÍNTESIS DE ARN MENSAJERO (TRANSCRIPCIÓN?) Y CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA**

---

Además de las evidencias aquí presentadas donde se cuestiona la participación de la síntesis de proteínas en la consolidación de la memoria por estudios de sobrerreforzamiento, Canal y colaboradores (2007), demostraron que la administración de anisomicina en la amígdala, produjo una liberación masiva de neurotransmisores (dopamina, noradrenalina y serotonina), concluyendo que estos efectos son lo que generaron el efecto amnésico y no la inhibición de la síntesis de proteínas. Efectos similares fueron encontrados en trabajos donde la administración se realizó en el hipocampo dorsal, en donde además, se midió una liberación excesiva de acetilcolina. (Qi y Gold., 2009).

Sin embargo, otros resultados han conducido al planteamiento de que los inhibidores de la síntesis de proteínas antes citados bloquean a nivel de la traducción que se lleva a cabo en el ribosoma, lo cual deja abierta la posibilidad de que los ARNm puedan finalizar su síntesis de proteínas en otros sitios de la neurona, como en mitocondrias o ribosomas libres en las terminales dendríticas (Redondo y Morris, 2011; Willis y Jeffery, 2010); es por ello que se han realizado estudios en donde se han usado inhibidores de la transcripción, proponiendo que este proceso es requerido en primera instancia para la consolidación de la memoria.

Por otra parte, estudios que han tenido como objetivo determinar los perfiles de expresión génica inducidos por entrenamientos conductuales mediante técnicas de microarreglos de ADNc eDNA, técnicas de RT-PCR así como de hibridación *in situ* (Cavallaro et al., 2002; Donahue et al., 2002; Levenson et al., 2004; Robles et al.,

2003), y específicamente en el hipocampo (O' Sullivan et al., 2007), han identificado la participación de diversos genes en la consolidación de la memoria además se ha observado que existen ventanas temporales de expresión génica que ocurren en las primeras 24 horas después de haber aprendido algún evento; esto ha sido demostrado conductualmente al administrar inhibidores de la transcripción presenciando dos ventanas críticas para la expresión de genes regulados de manera positiva, la primera inmediatamente después del entrenamiento y la segunda durante la etapa temprana de consolidación de la memoria (2 – 6 horas posteriores al entrenamiento) (Igaz et al., 2002). Se ha propuesto que la primera onda transcripcional pertenece a la expresión incrementada de factores de transcripción (TFs), genes de expresión temprana (IEGs) (O' Sullivan et al., 2007), así como otros genes conocidos por ser regulados en respuesta a la activación de vías de señalización de MAPK (Levenson et al., 2004; Sirri et al., 2010). Dentro de los TFs que se han encontrado sobreexpresados, específicamente durante la tarea de evitación inhibitoria, se encuentra CREB-P1 (del inglés cAMP-responsive element binding protein) así como SRF (del inglés serum response factor) (O' Sullivan et al., 2007). Estos factores son conocidos por tener un rol en la iniciación de la consolidación de la memoria, además de que se ha determinado que una mala regulación de estos se relaciona con en la enfermedad de Alzheimer.

Dentro de los genes regulados inmediatamente después del aprendizaje, se encontraron niveles elevados de ARNm para diversas proteínas de tráfico celular donde se incluyen a la Lrp3 de la familia de Lrp (low-density lipoprotein receptor-related protein) las cuales tienen función en la internalización de proteínas transmembranales. Genes de expresión temprana como zif268, Arc, Homer 1a y c-fos B que han sido implicados en plasticidad sináptica y consolidación de la memoria (Okuno, 2011).

En experimentos conductuales realizados tanto en vertebrados como invertebrados, entrenados en tareas de aprendizaje espacial (Da Silva et al., 2008), condicionamiento operante (Igaz et al., 2002; Sangha et al., 2003; Boccia et al., 2007, Sherry et al., 2010) y condicionamiento al miedo (Vecsey et al., 2007; Merlo y Romano., 2008); y a los cuales se les administró inhibidores de la transcripción, se observó la existencia de una sola ventana temporal sensible a la inhibición de ARNm que ocurre durante o alrededor

del tiempo de entrenamiento (Pedreira et al., 1996; Igaz et al. 2002). Entre los inhibidores de la transcripción más usados encontramos a la actinomicina D (Sangha et al., 2003; Parsons et al., 2006; Vecsey et al., 2007; Alberini., 2009),  $\alpha$ -Amanitina (Igaz et al., 2002; Vianna et al., 2003; Da Silva et al., 2008) y el DRB (5,6- Dicloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosilbenzimidazol) (Igaz et al., 2002; Vianna et al., 2003; Parson et al., 2006; Da Silva et al., 2008; Sherry et al., 2010).

---

### 2.6.1. DRB Y SU ACCIÓN SOBRE LA SÍNTESIS DE ARNm

---

El DRB es un fármaco análogo del nucleótido purina descrito en los años 50's como un inhibidor sintético de la multiplicación de varios adenovirus y retrovirus, y es una droga potencial para el tratamiento en contra del VIH (Yamaguchi et al., 1998). Estudios recientes, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que el DRB es un inhibidor de ~~protein~~-quinasas de proteínas que afecta selectivamente a la (ARN polimerasa tipo II) RNAPII (del inglés RNA polimerase II), resultando en una producción de transcritos cortos en concentraciones similares (Zandomeni et al., 1982). Esta enzima es la encargada de llevar a cabo la transcripción, uno de los procesos celulares que de manera más directa controla la expresión génica. En células de mamíferos el tratamiento con DRB causa una dramática reducción en los niveles de ARNm (Seghal et al., 1976). La acción que tiene sobre la RNAPII es sobre la fase de elongación y se resume en tres principales acciones: sus blancos son solamente transcritos de genes de la clase II, no actúan directamente sobre la RNAPII sino que sobre la actividad cinasa y no inhibe factores de transcripción generales????. Además experimentos bioquímicos usando DRB han identificado diversos factores involucrados en la transcripción sensibles a DRB, como es la proteína DSIF (del inglés DRB-sensitivity inducing factor), que participa junto con otras proteínas especializadas, regulando el progreso de la RNAPII a lo largo de un templete de ADN (Kim et al., 2001).

---

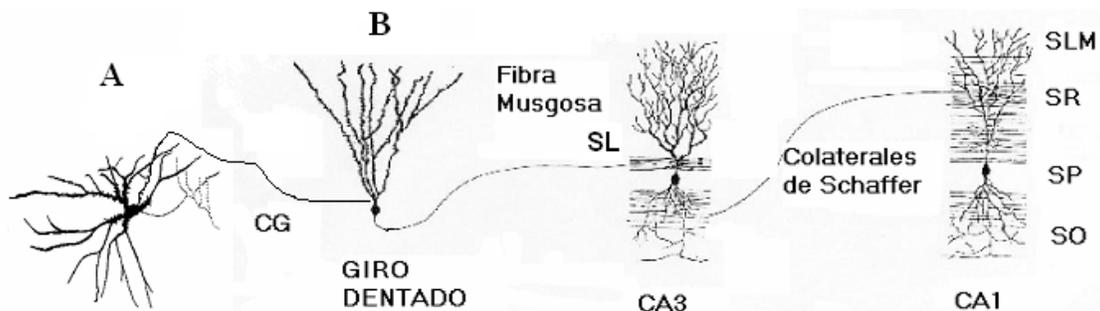
### 2.4. HIPOCAMPO Y SU FUNCIÓN EN LA MEMORIA

---

El hipocampo es una estructura subcortical localizada en el lóbulo temporal medio y forma parte del sistema límbico; en él se pueden distinguir tres regiones de naturaleza glutamatérgica: el giro dentado, formado por células granulares; el cuerno de Amon

(CA), formado por neuronas piramidales y que incluye los campos CA1, CA2 y CA3 y la región hilar formada por células polimorfos (Amaral et al., 2007). También existen interneuronas GABAérgicas presentes el cuerno de Amon. Las dendritas apicales de las células piramidales tienen proyecciones largas que ocupan la capa molecular y el estratum radiatum en el estratum lucidum. Por otra parte, las dendritas basales de estas neuronas se localizan en el stratum oriens (Fig. 2).

En CA3 existen las excrescencias torneadas, que son formaciones postsinápticas, proyecciones dendríticas muy grandes con muchas zonas activas y una gran cantidad de receptores membranales, a esta región llegan fibras que primordialmente liberan

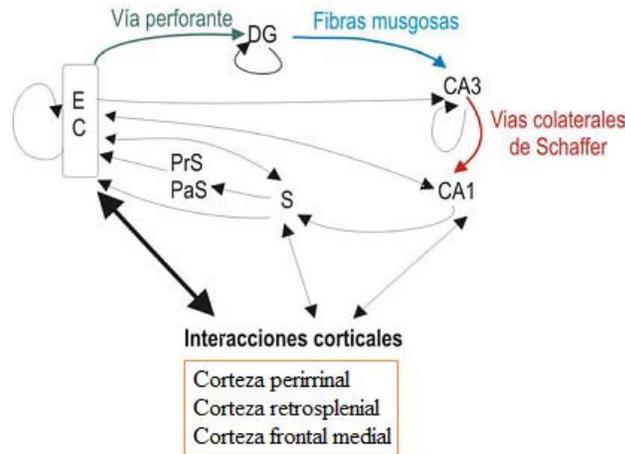


glutamato y neuropéptidos. Las células granulares del giro dentado proyectan hacia CA3 principalmente al estratum lucidum.

El hipocampo recibe información principalmente de la corteza entorrinal, por medio de la vía perforante, formando proyecciones corticohipocámpales mediante aferencias glutamatergicas que se distribuyen en mayor medida en el GD y alcanza regiones de CA; esta vía proporciona información sensorial supramodal procedente de todas las áreas corticales de asociación sensorial. También recibe proyecciones colinérgicas y

**Figura 2. Células de proyección que forman parte de la formación hipocámpal.** En la rata el término "formación hipocámpal" comprende seis regiones cito-arquitectónicamente diferentes: el hipocampo propiamente dicho que a su vez se divide en tres regiones (CA1, CA2 y CA3), el giro dentado (GD), el subiculum (S), el presubiculum (PrS), el parasubiculum (PaS) y la corteza entorrinal (CE). A, célula musgosa del hilus, B, célula granular (CG) del giro dentado de donde parte la fibra musgosa que hace sinapsis en el stratum lucidum (SL) de la célula piramidal del campo CA3, de esta célula parten las colaterales de Schaffer hacia el stratum radiatum (SR) de la célula piramidal (SP) del campo CA1, en donde se localizan también los estratos oriens (SO) y el lacunosum moleculare (SLM) (

aminérgicas que se distribuyen en GD y CA; estas provienen de la región septal y de



los núcleos de la formación reticular, a estas aferencias se les denomina sistema de fimbria- fornix (Almaguer-Melian et al., 2003).

Esta estructura diencefálica está involucrada en el procesamiento de la información espacial, y en el aprendizaje y la memoria episódica, declarativa y espacial (Eichenbaum, 1997; 1999). Algunos autores consideran que el hipocampo constituye un almacén transitorio en la formación de la memoria (Eichenbaum et al., 1996). Aunque participa, junto con otras áreas cerebrales, tanto en el almacenamiento como en la recuperación de la memoria, es una vez más el hipocampo el lugar donde se consolidan las memorias y con el paso del tiempo la información puede ser recuperada mediante la participación de circuitos sensoriales y corticales, sin que se requiera la participación del hipocampo (Tulving y Markowitsch, 1997). El primer reporte clínico que involucró al hipocampo como una estructura fundamental para la formación de la memoria fue el de Milner en los años 60's acerca del paciente H.M, quien a los 29 años de edad fue intervenido quirúrgicamente, pues padecía epilepsia intratable, removiéndosele la parte inferior y lateral del lóbulo temporal, con el objeto de eliminar las crisis convulsivas que presentaba. A pesar de que el tratamiento logró un decremento en la frecuencia con que las crisis epilépticas se presentaban, el paciente mostró inmediatamente una severa y persistente amnesia anterógrada (incapacidad para almacenar nueva

información) (Scoville y Milner, 1957). Estudios posteriores demostraron que en el paciente H.M. la memoria de procedimiento estaba intacta, ya que lograba recordar tareas de tipo motor; sin embargo su memoria declarativa estaba seriamente dañada, por lo que H.M. era incapaz de recordar información previamente presentada de tipo consciente, y se relacionó esta deficiencia con el hipocampo, que fue una de las estructuras incluidas en la remoción quirúrgica del lóbulo temporal (Corkin, 2002).

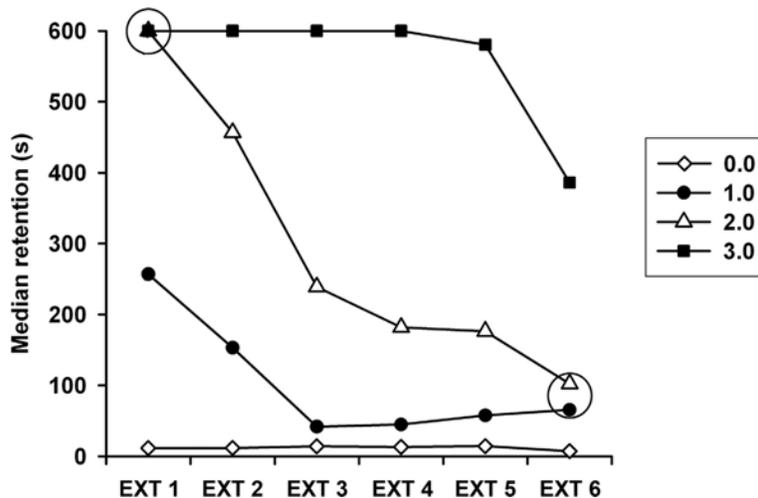
Estudios en ratas donde se ha lesionado el hipocampo, pone de manifiesto que esta estructura desempeña un papel importante en la representación espacial de contextos (Winocur et al., 1987; Penick y Solomon, 1991), en pruebas de condicionamiento del miedo al contexto (Rudy y O'Reilly, 1999). Además, también puede sustentar el procesamiento de información de carácter no espacial (Wallenstein et al., 1999), así como en tareas de EI (Izquierdo et al., 2002).

## **2.5. EFECTO PROTECTOR DEL APRENDIZAJE INCREMENTADO**

---

Se ha demostrado que existe efecto protector, inducido por entrenamiento incrementado, contra tratamientos que normalmente son amnésicos. Entrenamiento incrementado se refiere a la situación donde un individuo recibe un mayor número de sesiones de entrenamiento o intensidades de estimulación relativamente altas (sobrerreforzamiento). La fuerza del aprendizaje se mide habitualmente a través de la resistencia a la extinción. Extinción es la reducción de una respuesta condicionada cuando se omite el reforzador o el estímulo incondicionado (e.g., el choque eléctrico en aprendizajes de evitación) durante las pruebas de retención. Entre mayor es la fuerza del aprendizaje, mayor es la resistencia a la extinción, es decir, la respuesta condicionada tardará más tiempo en desaparecer (Fig. 4) (Garín-Aguilar, et al., 2011).

Varios investigadores han encontrado que con diversos tratamientos que normalmente interfieren con el proceso de consolidación en la tarea de EI existe un efecto protector a aplicar intensidades de choque más altas. Entre los tratamientos sistémicos estudiados en condiciones de sobrerreforzamiento y que son conocidos por producir amnesia, están aquellos que interfieren con la actividad serotoninérgica (Solana-Figueroa et al.,



2002), y los bloqueadores de receptores muscarínicos (Durán et al., 1990) y se observó que el sobrerreforzamiento impide que se produzcan estados amnésicos.

Este efecto protector también se ha observado después de la interferencia con la actividad de ciertas estructuras involucradas con el procesamiento de la memoria, como en estriado (Prado-Alcalá et al., 1978; Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Díaz del Guante et al., 1990), sustancia nigra (Cobos-Zapíaín et al., 1996), amígdala (Parent et al., 1992), corteza (ver referencias en Prado-Alcalá, 2007) e hipocampo (Quiroz et al., 2003). También, se han realizado estudios del efecto del sobrerreforzamiento de

**Figura 4. Curvas de extinción.** De grupos de ratas que recibieron 1.0, 2.0, ó 3.0 mA durante el entrenamiento. La intensidad de choque es mayor durante el entrenamiento. En cada una de las sesiones de extinción se evita la administración de los inhibidores de la síntesis de proteínas. Rodríguez-Ortiz y colaboradores (2008) encontraron que dependiendo de la cantidad de entrenamiento recibido antes de la primera inyección de anisomicina post entrenamiento en una tarea de memoria espacial, la memoria podía verse comprometida o no; estos investigadores reportan que cuando el entrenamiento era moderado (3 días de entrenamiento), la memoria era susceptible de ser alterada, mientras que cuando el entrenamiento era más intenso (5 días de entrenamiento) no se observó el afecto amnésico al momento de evaluar la memoria de largo plazo. Se ha observado que cuando se aumenta la intensidad de la estimulación aversiva en la tarea

de EI, hay una disminución del efecto amnésico que se produce por la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas 15 minutos antes del entrenamiento (Flood et al., 1973,1986; Quartermain et al., 1970). Trabajos más recientes realizados por Díaz-Trujillo y colaboradores (2009) observaron que en la misma tarea, el entrenamiento bajo condiciones de elevada intensidad de choque eléctrico ejerce un efecto protector contra la amnesia típicamente producida por un inhibidor de síntesis de proteínas, la cicloheximida (CHX).

Otros trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado los mismos efectos, por ejemplo, al administrar anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, directamente en hipocampo dorsal. Se observó que también hay un efecto protector del sobrerreforzamiento ante este tratamiento amnésico; por lo tanto, la inhibición de la síntesis de proteínas ya no interfiere con la consolidación, o bien ya no es necesario el hipocampo dorsal para esta tarea y otra estructura entra en relevo (Rodríguez-Serrano et al., 2009). Este efecto protector también se observó con la administración de anisomicina en corteza insular (Muñoz-Sánchez et al., 2010). Estos hallazgos permiten concluir que el requerimiento de síntesis de proteínas para la formación de la memoria de largo plazo es discutible. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio en el que se hayan investigado los efectos de alguno de estos inhibidores de la transcripción sobre el aprendizaje incrementado de una tarea de EI, el cual será el objetivo del presente proyecto.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

#### **3.1. HIPOTESIS**

---

Los antecedentes descritos nos permiten proponer las siguientes hipótesis de trabajo:

- La consolidación de la memoria de un aprendizaje moderado de evitación inhibitoria se bloqueará por la administración de un inhibidor de la transcripción en el hipocampo dorsal.
- La consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado de evitación inhibitoria se bloqueará por la administración de un inhibidor de la transcripción en el hipocampo dorsal.
- ¿Condensar en una?

#### **3.2. OBJETIVO GENERAL**

---

- Determinar el efecto amnésico de un inhibidor de la transcripción sobre la consolidación de memoria de un aprendizaje incrementado.

#### **3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

---

- Estudiar los efectos de la administración de diferentes dosis de DRB en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria en la prueba de evitación inhibitoria mediada por estímulos aversivos de intensidad relativamente baja.
- Estudiar los efectos de la administración de DRB en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de la prueba de evitación inhibitoria mediada por estímulos aversivos de intensidad relativamente alta.

- Estudiar los efectos de la administración de DRB en el hipocampo dorsal sobre el proceso de adquisición de la tarea de evitación inhibitoria.
- Estudiar si los efectos de la administración de DRB en el hipocampo dorsal antes del entrenamiento presenta un aprendizaje por dependencia de estado.

---

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---

El protocolo experimental de la presente tesis fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y a las normas estipuladas en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals del NIH (ILAR, 1996).

---

### 4.1. SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

---

Se utilizaron ratas macho, de la cepa Wistar, que pesaron entre 250 y 300 g, mantenidas en condiciones óptimas de bioterio y siguiendo las normas internacionales y del Comité de Ética del Instituto de Neurobiología. Las ratas fueron albergadas en el bioterio del laboratorio desde 5 días antes del procedimiento experimental manteniendo un ambiente controlado en temperatura (24°C) y humedad con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (con la luz iniciando a las 7:00 h), y con libre acceso a agua y alimento (Lab Diet, MR). Las ratas se asignaron de manera aleatoria a los diferentes grupos experimentales.

---

### 4.2. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

---

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg), combinado con atropina (0.4 mg/kg) administrados intraperitonealmente, se colocaron en el aparato estereotáxico (Kopf), en el cual se realizó de manera bilateral la inserción de cánulas fabricadas con agujas de acero inoxidable (calibre 23, de 10 mm de longitud) en el hipocampo dorsal en las siguientes coordenadas: anteroposterior -3.8 mm, mediolateral  $\pm 2.7$  mm de bregma y dorsoventral -2.8 mm a partir de la dura madre, de acuerdo al

atlas de Paxinos y Watson (1998). Se realizó una incisión en la piel en la línea media y después un trépano con un diámetro de 1mm en el cráneo bajo las coordenadas correspondientes y las cánulas se anclaron al hueso con la ayuda de un tornillo y con cemento dental. Después de haber realizado la cirugía, los sujetos de experimentación permanecieron en reposo pos-operatorio durante cinco días. Una vez transcurridos se iniciaron los procedimientos conductuales.

### 4.3. EVITACIÓN INHIBITORIA (EI)

---

#### 4.3.1. APARATOS

---

El entrenamiento y la prueba se realizaron en un aparato específicamente diseñado para estudiar el aprendizaje de EI de un sólo ensayo, que consiste en una cámara compuesta por dos compartimientos (30 x 30 x 30 cm cada uno) separados por una puerta tipo guillotina. Uno de los compartimientos estuvo iluminado por un foco incandescente de 40 W localizado en el centro de su tapa (compartimento de seguridad). El otro compartimento no iluminado, denominado “de castigo”, tiene paredes de acero inoxidable que forman una “V” hacia el centro del piso, entre las cuales hay 1.5 cm de separación, mismas que pueden ser electrificadas por



encontrarse conectadas a un estimulador que genera pulsos cuadrados (Grass Instruments Co., modelo S48G), conectado a una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., modelo CCU-1A). La duración de los estímulos, las latencias de entrada y de retención, que se definirán en la Sección de Procedimientos, se midieron con un sistema automatizado (Fig. 5). La cámara de condicionamiento se ubica en un cuarto sonoamortiguado y oscuro provisto de una fuente de ruido de fondo.

## 4.4. PROCEDIMIENTOS CONDUCTUALES

---

Después de haber concluido el tiempo post-operatorio se realizaron los siguientes procedimientos conductuales.

---

### 4.4.1. MANIPULACIÓN

---

Se manipuló por tres días a los sujetos de experimentación durante 3 minutos cada día, usando una toalla, sobre la que se colocó al animal mientras el experimentador revisó las cánulas (que no estuviesen tapadas), habituando así al sujeto al manejo del experimentador.

---

### 4.4.2. ENTRENAMIENTO

---

El día del entrenamiento cada animal se colocó dentro del compartimento de seguridad; 10 s después la puerta entre los dos compartimentos se abrió, y se midió el tiempo que tardó en cruzar al compartimento de castigo (*latencia de entrada*). Cuando los animales cruzaron a este compartimento la puerta se cerró y se administró un choque eléctrico; las intensidades del estímulo serán especificadas más adelante. Cinco segundos después la puerta se abre nuevamente permitiendo al animal escapar al compartimento de inicio apagándose entonces el estimulador. Se registró el tiempo que tardó en salir del compartimento de castigo y pasar al de seguridad (*latencia de escape*). Después de 30 segundos en el compartimento de inicio, el animal se regresó a su caja-hogar.

**Figura 5. Cámara de Evitación Inhibitoria.** Consiste en una cámara con dos compartimentos separados por una compuerta que se desliza a manera de guillotina; uno de los compartimentos está bien iluminado (compartimento de seguridad), el otro compartimento es oscuro (compartimento de castigo) y tiene un piso metálico a través del cual se dan pequeñas descargas eléctricas continuas durante 10 segundos ya que esta conectado a un estimulador de corriente.

4.4.3.

---

### PRUEBA DE RETENCIÓN

---

Durante esta prueba, se siguió el mismo protocolo de entrenamiento, excepto que no se administró el choque eléctrico. Se registró el tiempo que el animal tardó en pasar del compartimiento de seguridad al de castigo (*latencia de retención*). Si el animal no cruzaba al segundo compartimento en 600 segundos, la sesión se dio por terminada y se le asignó una latencia de retención de 600 segundos.

La prueba de retención se realizó a los 30 minutos o a las 48 horas después del entrenamiento, dependiendo del protocolo experimental.

---

#### 4.5. ADMINISTRACION DE DRB

---

La administración de DRB se realizó con una bomba de perfusión lenta (World Precision Instruments Inc., modelo sp200i, E.U.A.), acoplada a una microjeringa Hamilton de 10  $\mu$ l, conectada a través de un tubo de polietileno calibre PE-20 a un inyector de 11 mm de longitud, fabricado con un tubo de aguja hipodérmica de acero inoxidable del número 30. La infusión de 0.5  $\mu$ l se realizó durante un minuto y se dejó el microinyector dentro de la cánula durante un minuto adicional para permitir una mejor difusión. El DRB se diluyó en DMSO (dimetilsulfóxido) al 2%. Las dosis de DRB empleadas se describirán más adelante; los grupos controles recibieron 0.5  $\mu$ l del vehículo (DMSO)

---

#### 4.6. EXPERIMENTOS

---

---

##### 4.6.1. EXPERIMENTO 1: CURVA DOSIS RESPUESTA

---

En el primer experimento se realizó un diseño experimental de grupos independientes, con el propósito de conocer la dosis de DRB a la cual se obtiene el efecto óptimo para inducir amnesia cuando el fármaco se administra en el hipocampo dorsal, además se tuvo un grupo control (VEH) al cual se le administró el vehículo empleado para el fármaco. La intensidad de choque administrado fue de 1 mA en todos los grupos y la prueba de retención se realizó a las 48 horas después del entrenamiento, y se administró el DRB o VEH 15 minutos antes del entrenamiento de EI. Terminado el experimento los animales se perfundieron para corroborar la correcta colocación de las cánulas. A continuación se esquematiza el procedimiento a realizar:

Intensidad de Choque	1 mA			
	Veh	DRB	DRB	DRB
Dosis (ng/ 0.5 µl) por lado		20	40	80

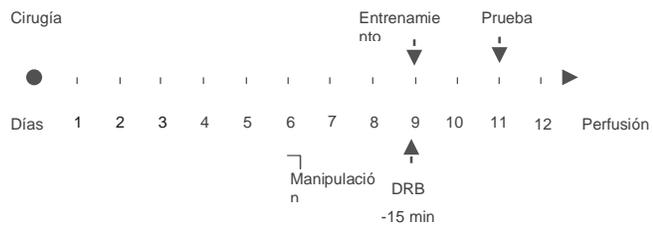


**Figura 6. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 1.** Vehículo: grupos control, DRB: grupos con administración de DRCON dosis de 20, 40 u 80 ng/0.5µl, La intensidad de choque en el entrenamiento fue de 1 mA (Izquierda). Línea temporal del experimento (Derecha).

#### 4.6.2. EXPERIMENTO 2: CURVA DE INTENSIDADES

Una vez obtenida la dosis adecuada para producir el efecto amnésico, se procedió a realizar la curva de intensidad de choque que se administró, esto con el objetivo de determinar si el aprendizaje incrementado protege a la memoria contra el efecto amnésico de los inhibidores de la transcripción, para ello se administraron dos intensidades de choque (1.0 y 2.0 mA). El diseño experimental empleado es de grupos independientes para cada intensidad de choque. El siguiente esquema muestra el procedimiento a realizar:

Intensidad de Choque	1 mA	2 mA
	Veh	
Dosis (ng/ 0.5 µl) por lado	DRB 80ng	



**Figura 7. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 2.** Vehículo: grupos control, DRB: grupos con administración de DRB con una dosis de 80 ng/0.5µl, La intensidad de choque en el entrenamiento correspondió 1 o 2 mA (Izquierda). Línea temporal del experimento (Derecha).

#### 4.6.3. EXPERIMENTO 3: DEPENDENCIA DE ESTADO

Ya que los tratamientos fueron administrados antes del entrenamiento, los sujetos están bajo el efecto de la droga durante la adquisición de la tarea, pero durante la prueba de

retención (48 horas después) la droga ya no está en el sistema; debido a esto podría ocurrir un fenómeno de dependencia de estado, una forma peculiar de aprendizaje en la que la información que ha sido aprendida mientras el animal se encuentra bajo la influencia de una cierta droga (estado) puede ser recordada y usada para resolver una tarea sólo cuando el animal se encuentra en el mismo estado en el cual la información fue aprendida, pero no en un estado diferente, por ejemplo cuando no está bajo la influencia del fármaco. Para determinar si este es el caso, se entrenaron dos grupos independientes de ratas en la tarea de EI con 1 mA. Se administró vehículo y DRB (80 ng) tanto 15 minutos antes del entrenamiento como 15 minutos antes de la prueba de retención a las 48 h. En la siguiente figura se esquematiza el procedimiento realizado:



**Figura 8. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 3.** Vehículo: grupo control, DRB: grupo con administración de DRB con una dosis de 80 ng/0.5µl, La intensidad de choque en el entrenamiento correspondió 1 mA (Izquierda). Línea temporal del experimento (Derecha).

#### 4.6.4. EXPERIMENTO 4: MEMORIA DE CORTO PLAZO

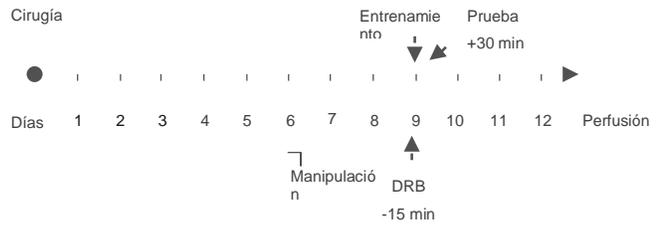
Para determinar si los efectos del fármaco DRB inyectado antes del entrenamiento se ejercen sobre la consolidación de la memoria o sobre el

Intensidad	<b>1 mA</b>
------------	-------------

aprendizaje, se administró vehículo o DRB a grupos de

ratas independientes y 15 minutos después se entrenaron con 1 mA en la tarea de EI. Se midió la retención 30 minutos después del entrenamiento (MCP). Los deterioros de la MCP sugerirían un deterioro en el aprendizaje. La ausencia de deterioros en la MCP indicaría que las deficiencias en la retención a las 48 hr (MLP) se explican mejor como una interferencia con la consolidación de la memoria. A continuación se esquematiza el procedimiento realizado:

de choque		
Dosis	<b>Veh</b>	<b>DRB 80</b>
(ng/ 0.5 µl)		
por lado		



**Figura 9. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 4.** Vehículo: grupo control, DRB: grupo con administración de DRB con una dosis de 80 ng/0.5µl, La intensidad de choque en el entrenamiento correspondió 1 mA (Izquierda). Línea temporal del experimento (Derecha).

#### 4.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Al término de las pruebas conductuales los animales se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital sódico, por vía intraperitoneal, y posteriormente se perfundieron con paraformaldehído al 4 %, por vía intraventricular, con la finalidad de remover las células sanguíneas del tejido cerebral. Se extrajo el cerebro, y se realizaron cortes coronales de 50 µm de grosor y se tiñeron con la técnica de Nissl. Finalmente se observaron al microscopio, con la finalidad de determinar si las puntas de las cánulas se colocaron en la zona deseada, y descartar del experimento a los sujetos que las tuvieran fuera la misma.

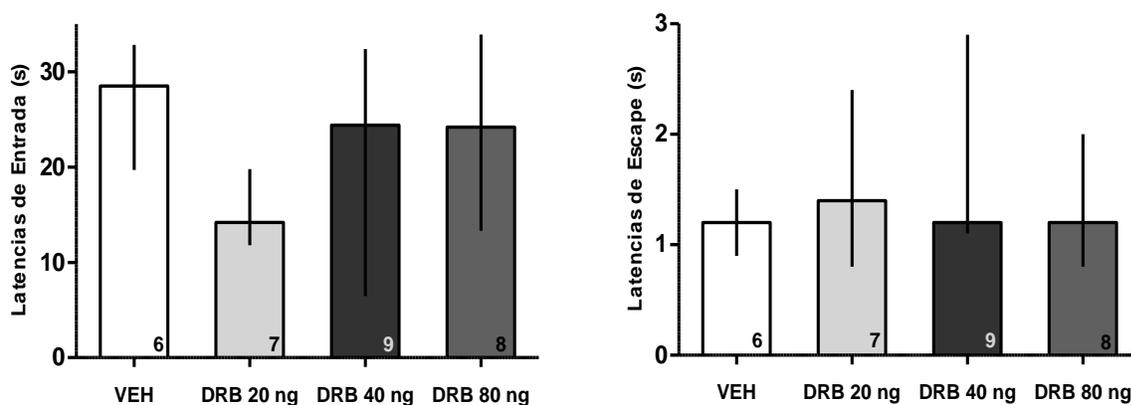
#### 4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido al punto de corte arbitrario impuesto a la latencia de retención (600 s), los datos derivados de las pruebas de retención no se distribuyeron de forma normal. Por esta razón se utilizó estadística no paramétrica. Se realizaron análisis independientes para las latencias de adquisición, escape y retención, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando fue apropiado, se usó la prueba U de Mann-Whitney para comparar la ejecución entre pares de grupos ( $p < 0.05$  considerado significativo). Los datos se presentaran como medianas  $\pm$  sus rangos intercuantiles.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CURVA DOSIS RESPUESTA

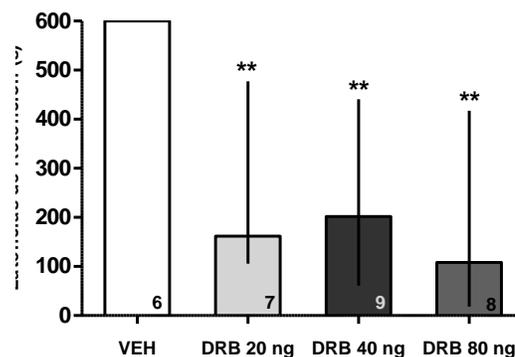
En la sesión de entrenamiento se obtuvieron las latencias de entrada y las latencias de escape. No se encontraron diferencias significativas en las latencias de entrada ( $H = 3.246$ ,  $p = 0.3553$ ) y latencias de escape ( $H = 1.086$ ,  $p = 0.7805$ ) entre los grupos experimentales y controles para las diferentes dosis administradas pre-entrenamiento (Fig. 10).



**Figura 10. Experimento 1. Latencias de entrada (Izquierda) y Latencias de Escape (Derecha).** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartiles de las latencias de entrada y escape de los grupos a los que se administró vehículo (VEH) o diferentes dosis de DRB15 min antes del entrenamiento en el hipocampo dorsal, especificadas debajo de cada barra. Los números dentro de cada barra representan el tamaño de las muestras.

Por otra parte, el análisis estadístico de la latencia de retención mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos ( $H=10.51$ ,  $p=0.0147$ ). Una prueba de *post-hoc* U de Mann Whitney reveló que las dosis de 20 ng ( $U=3$ ,  $p=0.0066$ ), 40 ng ( $U=3$ ,  $p<0.0088$ ) y 80 ng ( $U= 3$ ,  $p<0.0047$ ) produjeron deficiencias significativas en la retención de la tarea al ser comparadas con el grupo control (VEH). (Fig. 11).

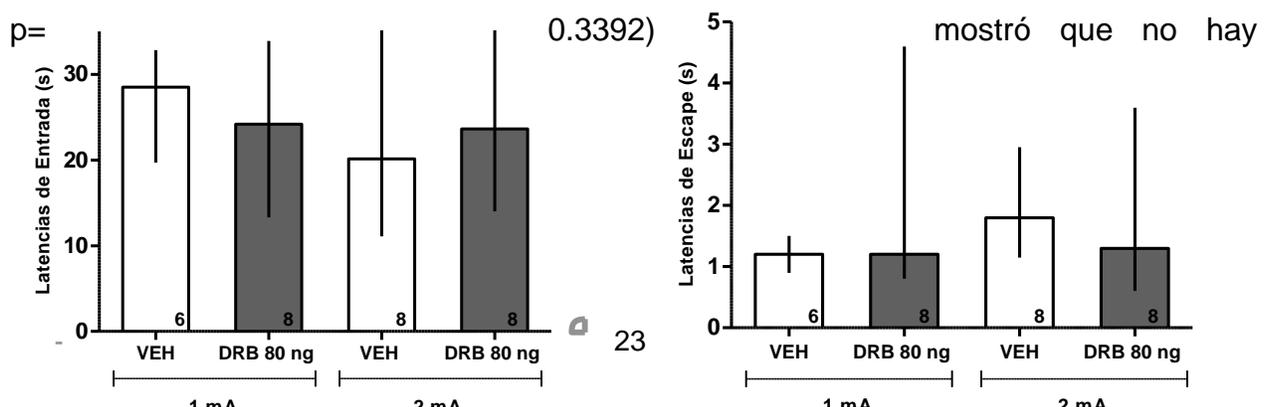
Recordemos que las latencias bajas de retención nos indican que en los sujetos no hubo consolidación de la memoria, mientras que las latencias altas indican que hubo una buena retención de la tarea y por tanto aprendizaje.



**Figura 11. Experimento 1. Latencias de retención.** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartilares de las latencias de retención de los grupos a los que se administró vehículo o diferentes dosis de DRB pre-entrenamiento en el HD, especificadas debajo de cada barra. ( \*\*P < 0.01 con respecto a VEH).

## 5.2. CURVA DE INTENSIDADES

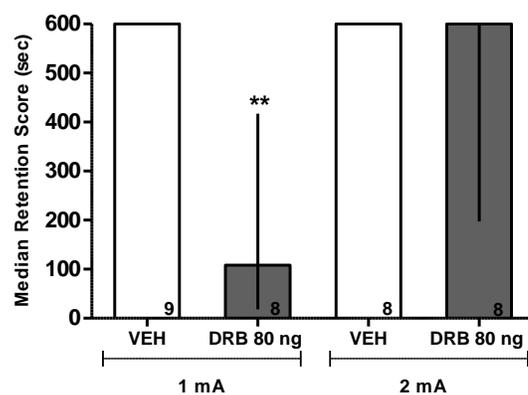
Se decidió emplear la dosis de 80 ng/0.5  $\mu$ l para inducir amnesia en la tarea de EI para éste y para los siguientes experimentos, ya que es una dosis en la que se encontró el mayor efecto amnésico al realizar la curva dosis respuesta. El análisis estadístico de las latencias de entrada ( $U = 30.50$ ,  $p= 0.9163$ ) y de las latencias de escape ( $U = 22.50$ ,



diferencias significativas entre el grupo experimental y el control para la intensidad de 2 mA de choque eléctrico (Fig. 12).

**Figura 12. Experimento 2. Latencias de entrada (Izquierda) y Latencias de Escape (Derecha).** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartilares de las latencias de entrada de los grupos a los que se administró vehículo (VEH) o diferentes dosis de DRB pre-entrenamiento en el HD, especificadas debajo de cada barra.

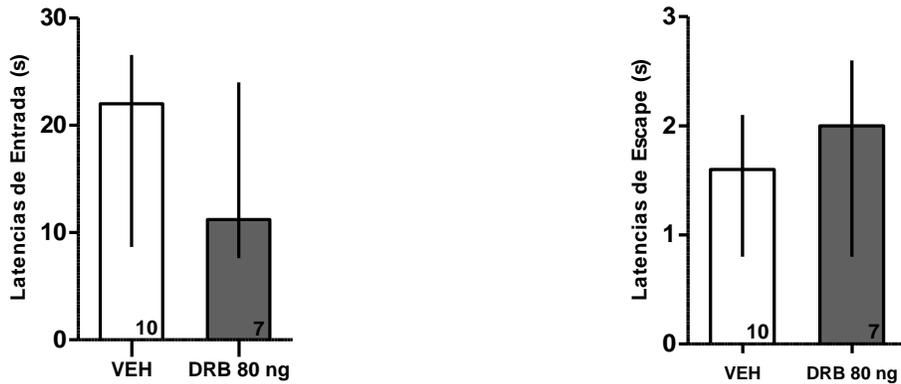
El análisis estadístico de las latencias de retención indicó que hay diferencias significativas entre el grupo tratado con DRB respecto a su grupo control (VEH) que fueron entrenados con 1.0 mA; en contraste, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos cuando se aplicó una intensidad de choque eléctrico de 2.0 mA ( $U = 22.5$ ,  $p = 0.4078$ ) (Fig. 13).



**Figura 13. Experimento 2. Latencias de retención.** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartilares de las latencias de entrada de los grupos a los que se administró vehículo o DRB (80 ng) pre-entrenamiento en el HD, y que se les administró un choque eléctrico de 1 o 2 mA especificados debajo de cada barra. (\*\* $P < 0.01$ )

### 5.3. MEMORIA DE CORTO PLAZO (MCP)

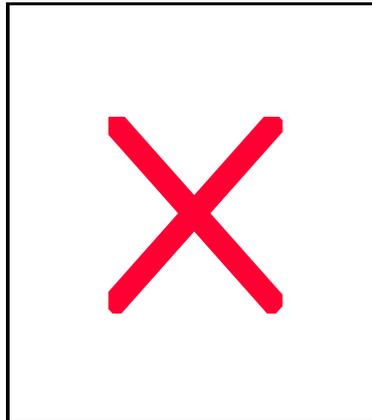
El análisis estadístico de las latencias de entrada y de las latencias de escape mostró que no hay diferencias significativas entre el grupo experimental y el grupo control (Fig. 14).



**Figura 15. Experimento 2. Latencias de Retención de MCP** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartiles de las latencias de retención medidas 30 minutos, después del entrenamiento, de los grupos a los que se administró VEH o DRB (80 ng) pre-entrenamiento en el HD, especificadas debajo de cada barra.

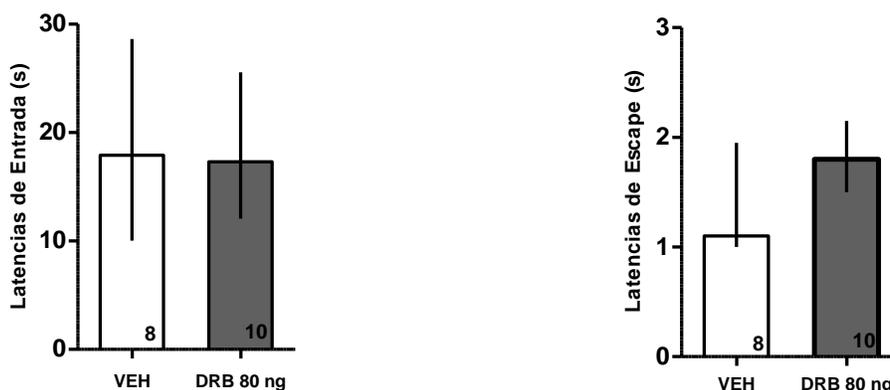
El

análisis estadístico de las latencias de retención indicó que no hay diferencias significativas ( $U = 20$ ,  $p = 0.1131$ ) entre el grupo tratado con DRB respecto a su grupo control que fueron entrenados con 1.0 mA y evaluados 30 min después del entrenamiento (MCP) (Fig.15).



#### 5.4. DEPENDENCIA DE ESTADO

No se encontraron diferencias significativas en las latencias de entrada ( $U = 40$ ,  $p = 1$ ) y latencias de escape entrada ( $U = 25$ ,  $p = 0.1897$ ) entre el grupo que recibió DRB (80 ng) y vehículo pre-entrenamiento (Fig. 16).

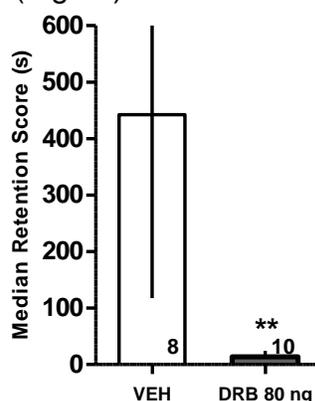


**Figura 16. Experimento 4. Latencias de entrada (izquierda) y Latencias de Escape (derecha).** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartilares de los grupos a los que se les administró VEH y DRB (80ng) pre-entrenamiento en el HD.

Por

otra

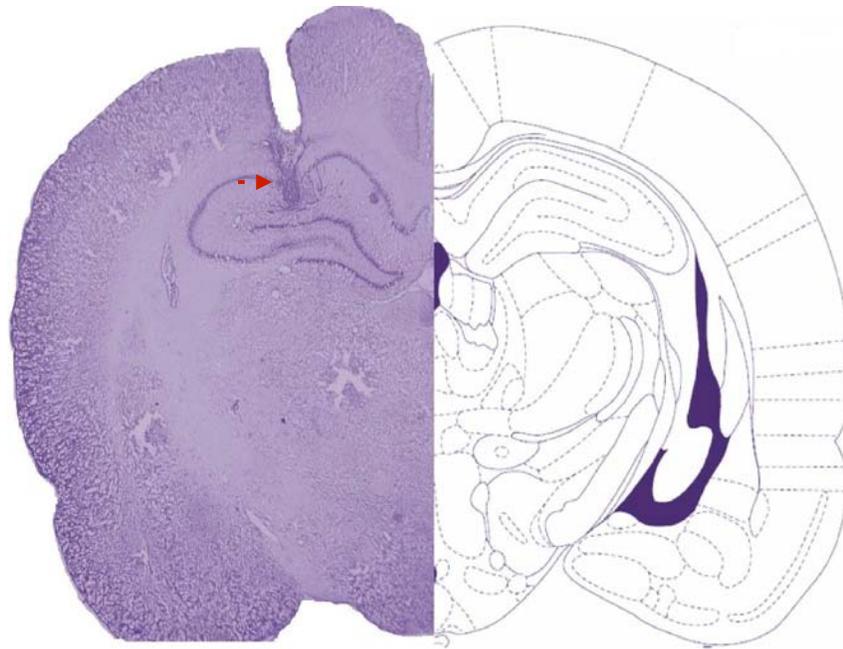
parte, el análisis estadístico de la latencia de retención mostró diferencias significativas entre el grupo tratado con DRB respecto al grupo vehículo que fueron administrados tanto 15 minutos antes del entrenamiento como 15 minutos antes de la prueba, entrenados con un choque eléctrico de 1.0 mA y evaluados 48 hrs después del entrenamiento ( $U = 6.5$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig.17)



**Figura 17. Experimento 4. Latencias de retención.** Están graficadas las medianas con sus rangos intercuartilares de las latencias de retención de los grupos a los que se administró VEH o DRB (80 ng) pre-entrenamiento y pre- prueba en el HD. (\*\* $P < 0.01$  con respecto a VEH).

5.5.

ANÁLISIS



HISTOLÓGICO

Las secciones del cerebro teñidos con violeta de cresilo obtenidos de los animales a los que se les colocó las cánulas a nivel de CA1 de hipocampo dorsal se muestran en la siguiente figura, se puede observar la distancia alcanzada por la cánula además de punto al cual llegó el inyector, por medio del cual se administró ya sea el vehículo o el fármaco DRB. Sólo las ratas con una correcta colocación bilateral de las cánulas y que mostraron el punto donde llegó el inyector fueron incluidas en el análisis estadístico.

**Figura 18. Análisis histológico.** *Fotomicrografía de un corte coronal teñido con violeta de cresilo de un cerebro de rata donde se observa el lugar de inserción de cánulas y su representación especular con una imagen obtenida del atlas de Paxinos y Watson (1998). La flecha indica la zona a donde llego el inyector.*

## 6. DISCUSIÓN

---

Los resultados obtenidos indican que la administración de vehículo o de las diferentes dosis de DRB en el hipocampo dorsal, no produce diferencias significativas en el tiempo que tardaron en entrar al compartimiento de castigo durante el entrenamiento, así como tampoco en el tiempo que tardaron en escapar del compartimiento de castigo al de seguridad, esto se observó en cada uno de los grupos de cada experimento (curva dosis respuesta, curva de intensidades, memoria de corto plazo y dependencia de

estado). Esto demuestra que el efecto amnésico producido por el DRB a ciertas dosis no se debió a un bloqueo inespecífico en el procesamiento de la información ni a daños en las funciones motoras, sensoriales o perceptuales necesarias para la ejecución de la respuesta condicionada; por lo tanto, puede inferirse que todos los grupos estudiados tuvieron la misma capacidad motora involucrada en el aprendizaje de la tarea, así como la misma capacidad para responder al estímulo aversivo. Estos resultados concuerdan con los observados por Da Silva y colaboradores (2008) donde evaluaron en una tarea variante de EI.

Por otra parte, los resultados de las latencias de retención de EI nos indican que la administración de DRB en el hipocampo dorsal con las dosis de 40 y 80 ng produce amnesia, y que no se encontró dicho efecto con la dosis de 20 ng, por tanto el DRB tiene un efecto dosis-respuesta con las dosis que se emplearon. Nuestros resultados concuerdan con la literatura, en el sentido en que se ha observado que la administración de DRB administrado antes del entrenamiento interfiere con la consolidación de la memoria evitando que se forme la MLP (Igaz, 2002). Con los resultados obtenidos se podría sugerir que, al menos bajo estas condiciones experimentales, es decir con un choque de intensidad relativamente baja (1mA), la síntesis de ARNm en hipocampo dorsal es necesaria para la consolidación de la memoria de una tarea de EI, pero que este efecto amnésico ya no se presenta cuando se aumenta la intensidad del choque dado durante el entrenamiento (2 mA), es decir, se observó el efecto protector del sobrerreforzamiento ante tratamientos amnésicos como el DRB. Estos resultados muestran que cuando se incrementa la experiencia de aprendizaje la inhibición de síntesis de ARNm ya no interfiere con la consolidación; dicho de otra manera, el proceso de transcripción ya no es requerido para la formación de MLP, al menos en esta estructura.

Sin embargo, recordemos que en estos experimentos el fármaco fue administrado previo al entrenamiento. Generalmente en este tipo de estudios de memoria, los tratamientos pre-entrenamiento no nos permiten hacer interpretaciones claras de los resultados conductuales, debido a que las deficiencias en la ejecución de las tareas podrían no ser causadas por interferencia con procesos mnemónicos, sino por

interferencia con variables motoras, perceptuales o motivacionales que no permiten la correcta adquisición de la tarea; para descartar esta posibilidad se decidió realizar dos experimentos controles: evaluar tanto la MCP como una posible dependencia de estado. Para determinar si los efectos del DRB inyectado antes del entrenamiento se ejercen sobre la consolidación de la memoria o sobre el aprendizaje, se midió la latencia de retención 30 minutos después del entrenamiento (MCP), y los resultados obtenidos demuestran que no existe una interferencia con el proceso de adquisición, ya que el grupo control y el tratado se comportaron de manera similar en la prueba, es decir no hubo déficits en la MCP; además se evaluó nuevamente 48 horas después del entrenamiento y se observó nuevamente el efecto amnésico.

Esto nos permite concluir, que en los experimentos anteriores (curva dosis respuesta y curva de intensidades) los cuadros amnésicos se debieron a una interferencia con el proceso de consolidación de la memoria, y no a una interferencia con la capacidad de aprendizaje y con el almacenamiento de información en la memoria de corto plazo. Estos datos apoyan a la teoría clásica que sugiere que para la formación de MCP sólo parece ser dependiente de la activación y/o modificaciones covalentes de proteínas localizadas en la sinapsis (Davis y Squire, 1984; McGaugh, 1966) y no se requiere de la síntesis de ARNm *de novo* (McGaugh, 2000; Kandel, 2001). Por otra parte al realizar el experimento de dependencia de estado los resultados nos muestran que cuando se administró el DRB tanto antes del entrenamiento como antes de la prueba, no se presentó un aprendizaje por dependencia de estado, ya que se observa nuevamente el efecto amnésico del DRB en el hipocampo dorsal encontrado en los experimentos previos de esta tesis. Además, el efecto amnésico de la DRB es consistente con el encontrado en trabajos previos (Igaz et al., 2002), por lo tanto podemos inferir que los resultados observados en los experimentos realizados anteriormente no está presente un aprendizaje dependiente de estado.

Existe una amplia evidencia experimental que nos indicaba que la síntesis de ARNm *de novo* es requerida para la consolidación de la memoria, ya que al administrar un inhibidor de la transcripción ésta se interfería (Igaz et al., 2002). Además en diversos estudios, se han aplicado las tecnologías de microarreglos de cDNA, técnicas de RT-

PCR así como de hibridación *in situ*, para definir los perfiles de expresión génica inducidos por entrenamientos conductuales en diferentes modelos animales (Cavallaro et al., 2002; Donahue et al., 2002; Levenson et al., 2004; Robles et al., 2003) específicamente en el hipocampo (O' Sullivan et al., 2007), para determinar su participación en el proceso de consolidación de la memoria. En estos estudios se ha concluido que existen ventanas temporales de expresión génica que ocurren en las primeras 24 horas después de haber aprendido algún evento; esto ha sido demostrado conductualmente al administrar inhibidores de la transcripción presenciando dos ventanas críticas para la expresión de genes regulados de manera positiva, la primera inmediatamente después del entrenamiento y la segunda durante la etapa temprana de consolidación de la memoria (2 – 6 horas posteriores al entrenamiento) (Igaz et al., 2002). Se ha propuesto que la primera onda transcripcional pertenece a la expresión incrementada de factores de transcripción (TFs), genes de expresión temprana (IEGs) (O' Sullivan et al., 2007), así como otros genes conocidos por ser regulados en respuesta a la activación de vías de señalización de MAPK (Levenson et al., 2004; Sirri et al., 2010). Dentro de los TFs que se han encontrado sobreexpresados, específicamente durante la tarea de evitación inhibitoria, se encuentra CREB-P1 (del inglés cAMP-responsive element binding protein) así como SRF (del inglés serum response factor) (O' Sullivan et al., 2007).

Estos factores son conocidos por tener un rol en la iniciación de la consolidación de la memoria, además de que se ha determinado que una mala regulación de estos se relaciona con en la enfermedad de Alzheimer. Dentro de los genes regulados inmediatamente después del aprendizaje, se encontraron niveles elevados de ARNm para diversas proteínas de tráfico celular donde se incluyen a la Lrp3 de la familia de Lrp (low-density lipoprotein receptor-related protein) las cuales tienen función en la internalización de proteínas transmembranales; con base en estas evidencias podríamos inferir que en el presente trabajo se interfirió con la expresión de estos genes, ya que el fármaco DRB ejerció su efecto dentro de la primera ventana temporal que se ha descrito como crítica para la formación de la memoria. Los reportes hasta ahora han sido consistentes ya que la propuesta de que síntesis de ARNm *de novo* es requerida para la consolidación de la memoria se ha observado a través de distintas

especies, en diversas tareas conductuales (Igaz et al., 2002; Sangha et al., 2003; Boccia et al., 2007, Sherry et al., 2010), habiéndose corroborado esta propuesta en el presente proyecto, como muestran los resultados del primer experimento. Por lo tanto, podemos afirmar que la síntesis de ARNm *de novo* en el hipocampo dorsal es requerida para la consolidación de la tarea de EI con una intensidad de choque relativamente baja.

No obstante al incrementar la intensidad de choque (2mA) este proceso de transcripción en el hipocampo ya no es requerido, puesto que el efecto amnésico desaparece; este mismo fenómeno donde se observa un efecto protector del sobreforzamiento ha sido puesto en evidencia ante otros tratamientos amnésicos en la misma estructura (Quiroz et al., 2003) incluso al interferir con la síntesis de proteínas (administrando anisomisina, un inhibidor que actúa a nivel traduccional) (Rodríguez-Serrano et al., 2009), proceso que se ha sugerido también es requerido para la formación de MLP. También se ha reportado que la anisomisina tiene efectos secundarios ya que incrementa la liberación masiva de neurotransmisores (dopamina, noradrenalina y serotonina), lo que ha llevado a la conclusión de que su efecto amnésico se debe a sus efectos secundarios y no a una inhibición en la síntesis de proteínas *per se* (Canal et al., 2007). Este tipo de resultados ha puesto en duda si la consolidación de la memoria depende la síntesis de proteínas.

Hasta el momento no se habían mostrado evidencias que pusieran en duda el requerimiento de la síntesis de ARNm *de novo* para la consolidación de una MLP. Sin embargo con los resultados aquí presentados es cuestionable la participación de este proceso molecular, ya que observamos que ante un aprendizaje incrementado la interferencia con la transcripción no produce amnesia y estos datos dan apoyo al modelo de procesamiento en paralelo propuesto por Prado-Alcalá (1995) el cual postula que en condiciones de sobreforzamiento o sobreentrenamiento, las estructuras que inicialmente estaban conectadas en serie sufren un cambio, conectándose funcionalmente en paralelo. Así, a pesar de que alguna de las estructuras que integran el circuito no funcione normalmente, la actividad derivada de la experiencia de aprendizaje podrá continuar su trayecto hacia el posible centro integrador, posibilitando

de esta manera la consolidación de la memoria. Por lo tanto se sugiere que alguna otra estructura está entrando en relevo o bien el proceso de transcripción ya no es requerido para la consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado de EI.

## **7. CONCLUSIONES**

---

- La administración de DRB en el hipocampo dorsal interfiere con la consolidación de la memoria de EI, cuando se emplea una intensidad de choque relativamente bajo (1.0 mA).
- La administración de DRB en el hipocampo dorsal no tiene efectos en la adquisición ni en la MCP, pero interfiere con la consolidación y la MLP de EI cuando se emplea una intensidad de choque relativamente bajo (1.0 mA).

- El efecto amnésico de DRB en el hipocampo dorsal no se presenta cuando se entrena con una intensidad de choque relativamente alta (2.0 mA) en EI.
- Hay un efecto protector del sobrerreforzamiento ante tratamientos amnésicos como la DRB en el hipocampo dorsal, por lo tanto la inhibición del proceso de transcripción ya no interfiere con la consolidación, o bien ya no es necesario el hipocampo dorsal para esta tarea y otra estructura entra en relevo.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

**Atkinson RC** y Shiffrin RM. 1971. The control of short-term memory. *Scientific American*. 225, 82-90.

**Alberini CM**. 2009. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews* 89,121-45.

**Almaguer-Melian W**, Vallejo A, Ramírez M, Capdevila V, Rosillo-Martí JC y Bergado-Rosado JA. 2003. Estudio comparativo de la lesión bilateral de corteza entorrinal y de la fimbria-fórnix. *Revista de Neurología* 37, 619-622.

**Amaral D**, Scharfman, HE y Lavenex P. 2007. The dentate gyrus fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research* 163, 3-22.

**Ambrogio-Lorenzini C**, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B y Tassoni G. 1996. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research*. 730, 32–39.

**Bekinschtein P**, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53, 261- 77.

**Boccia M**, Freudenthal R, Blake M, de la Fuente V, Acosta G, Baratti C y Romano A. 2007. Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *Journal of Neurosciences* 27, 13436-45.

**Canal CE**, Chang Q y Gold PE. 2007. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intra amygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12500–12505.

**Cavallaro S**, D' Agata V, Manickam P, Dufour F y Alkon DL. 2002. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16279–16284.

**Clement JQ** y Wilkinson MF. 2000. Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *Journal of Molecular Biology* 299, 1179-91.

**Cobos-Zapiaín GG**, Salado-Castillo R, Sánchez-Alavez M, Quirarte GL, Roldán-Roldán G, Díaz del Guante MA y Prado-Alcalá RA. 1996. High level of footshock during

inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory* 65, 202-6.

**Corkin S.** 2002. What's new with the amnesic patient H.M.? *Naure Review Neurosciences* 3, 153-160.

**Da Silva WC,** Bonini JS, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I y Cammarota M. 2008. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus* 18, 29-39.

**Davis HP** y Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin* 96, 518–559.

**Debiec J,** LeDoux J y Nader K. 2002. Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. *Neuron* 36, 527-238.

**Díaz del Guante M,** Rivas-Arancibia S, Quirarte G y Prado-Alcalá RA. 1990. Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos* 38, 49-53.

**Díaz-Trujillo A,** Contreras J, Medina AC, Silveyra-Leon GA, Quirarte GL y Prado-Alcalá RA. 2009. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory* 91, 310-314.

**Domjan M.** 1999. *Principios de aprendizaje y conducta.* México: Internacional Thomson Editores.

**Donahue CP,** Jensen RV, Ochiishi T, Eisenstein I, Zhao M, Shors T y Kosik KS. 2002. Transcriptional profiling reveals regulated genes in the hippocampus during memory formation. *Hippocampus* 12,821–833.

**Duran-Arevalo M,** Cruz-Morales SE y Prado-Alcalá RA. 1990. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin* 24, 725-727.

**Eichenbaum H** y Fortin N. 2005. Bridging the gap between brain and behavior: cognitive and neural mechanisms of episodic memory. *Journal of Experimental Analysis of Behavior* 84, 619-629.

**Eichenbaum H.** 1997. How does the brain organize memories? *Science* 277, 330-332.

**Eichenbaum H.** 1999. Neurobiology. The topography of memory. *Nature* 402, 597-599.

**Eichenbaum H**, Schoenbaum G, Young B y Bunsey M. 1996. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93, 13500-13507

**Emptage NJ** y Carew TJ. 1993. Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons. *Science* 262, 253-6.

**Erdelyi MH.** 2010. The ups and downs of memory. *The American Psychologist* 65, 623-33.

**Flood JF**, Rosenzweig MR, Bennett EL y Orme AE. 1973. The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiology & Behavior* 10, 555-562.

**Flood JF**, Smith GE, Bennett EL, Alberti MH, Orme AE y Jarvik ME. 1986. Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 24, 631-645.

**Frankland, PW, y Bontempi B.** (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 119–130.

**Giordano M**, y Prado-Alcalá RA. 1986. Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology Biochemistry & Behavioral* 24, 905-9.

**Gold PE.** 2006. The many faces of amnesia. *Learning and Memory.* 13, 506-14.

**Igaz LM**, Vianna MR, Medina JH e Izquierdo I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *Journal of Neurosciences*, 22, 6781-9.

**Izquierdo I**, DaCunha C, Rosat R, Jerusalinsky, D., Ferreira MB y Medina JH. 1992. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behavioral and Neural Biology* 58, 16–26.

**Izquierdo I**, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA y Medina JH. 1998. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, 635-6.

**Izquierdo I**, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH y Cammarota M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29, 496-505.

**Izquierdo LA**, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH e Izquierdo I. 2002. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22, 269-87.

**Kandel ER**. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.

**Kandel E**, Jessell T, y Schwartz J. 1997. *Neurociencia y Conducta*. Madrid: Prentice Hall.

**Kim DK**, Yamaguchi Y, Wada T y Handa H. 2001. The regulation of elongation by eukaryotic RNA polymerase II: a recent view. *Molecules and Cells* 11, 267-274.

**Lattal KM** y Abel T. 2001. Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *Journal of Neuroscience* 21, 5773–5780.

**Lattal KM**, Honarvar S y Abel T. (2004). Effects of post-session injections of anisomycin on the extinction of a spatial preference and on the acquisition of a spatial reversal preference. *Behavioural Brain Research* 153, 327–339.

**Lechner HA**, Squire LR y Byrne JH. 1999. 100 Years of Consolidation-Remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*. 6, 77-87.

**Levenson JM**, Choi S, Lee SY, Cao YA, Ahn HJ, Worley KC, Pizzi M, Liou HC y Sweatt JD. 2004. A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. *Journal of Neurosciences* 24, 3933–3943.

**Martínez I**, Quirarte GL, Díaz-Cintra S, Quiroz C y Prado-Alcalá RA. 2002. Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology* 46, 97–103.

**Meiri N** y Rosenblum K. 1998. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Research* 789, 48-55.

**Merlo E**, Freudenthal R y Romano A. 2002. The I $\kappa$ B kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112, 161–172.

**McGaugh J**. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153, 1351-1358.

**McGaugh J**. 2000. Memory: A Century of Consolidation. *Science*, 287, 248-251.

**Mendoza G**. 2002. Aprendizaje. En Téllez, L. A. (Ed.). Atención, Aprendizaje y Memoria. Aspectos Psicobiológicos. México: Trillas.

**Miyashita T**, Kubik S, Haghghi N, Steward O y Guzowski JF. 2009. Rapid activation of plasticity-associated gene transcription in hippocampal neurons provides a mechanism for encoding of one-trial experience. *Journal of Neuroscience* 29, 898-906.

**Morgado, I**. 2005. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología* 40, 289-297.

**Morris RG** y Frey U. 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philosophical Transaction of the Royal Society London B Biological Sciences* 352, 1489 –1503.

**Muñoz-Sánchez S**, Medina AC, Quirarte GL y Prado-Alcalá RA. Efectos de la administración de anisomicina, inhibidor de la síntesis de proteínas, en la corteza

insular sobre la memoria de corto plazo de un aprendizaje incrementado en una tarea de evitación inhibitoria. LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Villahermosa, Tab., Septiembre, 2010

**O'Sullivan NC**, McGettigan PA, Sheridan GK, Pickering M, Conboy L, O'Connor JJ, Higgins DG, Regan CM y Murphy KJ. 2007. Temporal change in gene expression in the rat dentate gyrus following passive avoidance learning. *Journal of Neurochemistry* 101, 1085-98.

**Okuno H**. 2011. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Research*, 69,175-186.

**Parent MB**, Tomaz C y McGaugh JL. 1992. Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of posttraining N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behavioral Neurosciences* 106, 789-97.

**Paxinos G** y Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.

**Parsons RG**, Gafford GM, Baruch DE, Riedner BA y Helmstetter FJ. 2006. Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *The European Journal of Neurosciences* 23, 1853–1859.

**Pedreira ME**, Dimant B y Maldonado H. 1996. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 54, 611-617.

**Penick S** y Solomon PR. 1991. Hippocampus, context, and conditioning. *Behavioral Neurosciences*, 105, 611-617.

**Prado-Alcalá RA**, Bermúdez-Rattoni F, Velázquez-Martínez DN y Bacha G. 1978. Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: overtraining induced protection against behavioral deficits. *Life Science* 23, 889-96.

**Prado-Alcalá RA**. 1985. Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences* 37, 2135-2142.

**Prado-Alcalá RA** 1995. Serial and parallel processing during memory consolidation. En McGaugh JL, Bermúdez-Rattoni F y Prado-Alcalá RA (Eds) *Plasticity in the central nervous system: learning and memory* (pp. 57-65) New Jersey: Erlbaum.

**Prado-Alcalá RA** y Quirarte GL. 1998. De la memoria y el cerebro. En De la Fuente R y Álvarez Leefmans FJ. *Biología de la mente*. México. Fondo de Cultura Económica, (pp.423-454).

**Prado-Alcalá RA**, Cobos-Zapíaín GG, Salado-Castillo R, Quiroz C, Garín-Aguilar ME, Díaz A, Díaz del Guante MA, Medina AC, Martínez I y Quirarte GL. 2006. El aprendizaje incrementado protege a la memoria contra tratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta* 32, 203-218.

**Prado-Alcalá RA**, Fernández-Ruiz J y Quirarte, GL. 1993 Cholinergic neurons and memory. En Stone TW (Eds) *Synaptic Transmission 2* (pp. 59-71) London

**Prado-Alcalá RA** y Quirarte GL. 2007. La Consolidación De La Memoria: Un Siglo Después. *Neurología* 45, 284-292.

**Qi Z** y Gold, PE. 2009. Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. *Learning and Memory* 16, 308-314.

**Quiroz C**, Martínez I, Quirarte GL, Morales T, Díaz-Cintra S y Prado-Alcalá RA. 2003. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research* 153, 400-2.

**Quartermain D**, McEwen BS y Azmitia EC. 1970. Amnesia produced by electroconvulsive shock or cycloheximide: conditions for recovery. *Science* 169, 683-686.

**Redondo RL** y **Morris** RG. 2011. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews. Neurosciences*, 12,17-30.

**Robles Y**, Vivas-Mejía PE, Ortiz-Zuazaga HG, Félix J, Ramos X y Peña de Ortiz S. 2003. Hippocampal gene expression profiling in spatial discrimination learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 80, 80–95.

**Rodríguez-Ortiz C**, Garcia-DeLaTorre P, Benavidez E, Ballesteros M, Bermudez-Rattoni F. 2008. Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiology of Learning and Memory* 89, 352- 359.

**Rodríguez-Serrano LM**, Medina AC, Quirarte GL y Prado-Alcalá RA. La inhibición de la síntesis proteínica en el hipocampo dorsal no interfiere con la consolidación de la memoria de un aprendizaje sobrerreforzado. LII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Morelia, Mich., Septiembre, 2009.

**Rosenzweig M. y Leiman A.** 1998. *Psicología Fisiológica*: Mc Graw Hill.

**Routtenberg A y Rekart JL.** (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends in Neurosciences* 28, 12-9.

**Rudy JW**, O'Reilly RC. 1999. Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behavioral Neurosciences* 113, 867-880.

**Salado-Castillo R**, Sánchez-Alavéz M, Quirarte GL, Martínez García MI, Prado-Alcalá RA. 2011. Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neurosciences*. 18, 5:83.

**Sandi C.** 1998. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plasticity* 6, 41–52.

**Sangha S**, Scheibenstock A, Lukowiak K. 2003. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *Journal of Neurosciences* 23,8034–8040.

**Scoville WB** y Milner B. 1957. Loss of recent memory alter bilateral hippocampal lesions. *The Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 20, 11-21.

**Sehgal PB**, Darnell JE Jr y Tamm I. 1976. The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* 9,473-480.

**Sherry JM**, Milsome SL y Crowe SF. 2010. The roles of RNA synthesis and protein translation during reconsolidation of passive-avoidance learning in the day-old chick. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 94, 438-46.

**Sirri A**, Bianchi V, Pelizzola M, Mayhaus M, Ricciardi-Castagnoli P, Toniolo D y D'Adamo P. 2010. Temporal gene expression profile of the hippocampus following trace fear conditioning *Brain Research* 13,14-23.

**Solana-Figueroa R**, Salado-Castillo R, Quirarte GL, Galindo LE y Prado-Alcala RA. 2002. Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences* 71, 391-399.

**Stubley-Weatherly L**, Harding JW, y Wright JW. 1996. Effects of discrete kainic acid induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats. *Brain Research*. 716, 29–38.

**Tulving E** y Markowitsch HJ. 1997. Memory beyond the hippocampus. *Current Opinion in Neurobiology*, 7: 209-216.

**Vecsey CG**, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, Cabrera SM, McDonough CB, Brindle PK, Abel T y Wood MA. 2007. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *Journal of Neurosciences*, 27: 6128-40.

**Vianna MR**, Igaz LM, Coitinho AS, Medina JH e Izquierdo I. 2003. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory* 79, 199-203.

**Wallenstein RE**, Simeral JD y Deadwyler SA. 1999. Distribution of spatial and nonspatial information in dorsal hippocampus. *Nature* 402, 610-614.

**Willis DE y Twiss JL.** 2010. Regulation of protein levels in subcellular domains through mRNA transport and localized translation. *Molecular and Cellular Proteomics*. MCP, 9, 952-62.

**Winocur G,** Rawlins JN y Gray TA. 1987. The hippocampus and conditioning to contextual cues. *Behavioral Neurosciences* 101, 617-625.

**Yamaguchi Y,** Wada T y Handa H. 1998. Interplay between positive and negative elongation factors: drawing a new view of DRB. *Genes to Cells* 3, 9-15.

**Zandomeni R,** Mittleman B, Bunick D, Ackerman S y Weinmann R. 1982. Mechanism of action of dichloro-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole: effect on in vitro transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 3167-70

---

## 9. ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Representación esquemática de la clasificación temporal de la memoria.....	4
Figura 2. Células de proyección que forman parte de la formación hipocámpica.....	9
Figura 3. Conexiones intrínsecas de la formación hipocámpica.....	10
Figura 4. Curvas de extinción .....	12
Figura 5. Cámara de Evitación Inhibitoria.....	16
Figura 6. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 1.....	18

Figura 7. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 2.....	19
Figura 8. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 3.....	20
Figura 9. Diseño experimental de grupos independientes para el experimento 4.....	20
Figura 10. Experimento 1. Latencias de Entrada y Latencias de Escape.....	22
Figura 11. Experimento 1. Latencias de Retención.....	22
Figura 12. Experimento 2. Latencias de Entrada y Latencias de Escape.....	23
Figura 13. Experimento 2. Latencias de Retención.....	23
Figura 14. Experimento 3. Latencias de Entrada y Latencias de Escape.....	24
Figura 15. Experimento 3. Latencias de Retención.....	24
Figura 16. Experimento 4. Latencias de Entrada y Latencias de Escape.....	25
Figura 17. Experimento 4. Latencias de Retención de MCP y de MLP.....	25
Figura 18. Análisis histológico.....	26