



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Participación del Hipocampo y
Corteza Insular en el almacenamiento
a largo plazo de la memoria de
reconocimiento de sabores.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Katia Leticia Martínez González



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Paola García de la Torre**

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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Martínez
González
Katia Leticia
54 25 06 14
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304157105

2. Tutora

Dra.
Paola
García
de la Torre

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Federico
Bermúdez
Rattoni

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Pilar
Durán
Hernández

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Rocío
Salceda
Sacanelles

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Ana Pamela
Salcedo
Tello

7. Datos del trabajo escrito

Título: Participación del hipocampo y corteza insular
en el almacenamiento a largo plazo de la memoria de
reconocimiento de sabores.

Número de páginas 63

Año: 2012

*A mis padres **Leticia González Vertíz** y **Alfonso Martínez Martínez**,
por brindarme siempre su apoyo y sus invaluable enseñanzas,
porque me educaron con hechos y no con palabras este logro
es fruto del esfuerzo, amor y trabajo conjunto de ambos.*

*A mis hermanos **Manuel** y **Daniel** por todos estos años de infinita alegría y aprendizaje juntos.*

*A **Christian** por ser mi compañero de viaje durante la carrera, mi mejor amigo, mi confidente, por
todo el amor incondicional, apoyo, aprendizaje y buenos momentos juntos.*

Agradecimientos académicos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 60487, y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN216709.

*Agradezco al **Dr. Federico Bermúdez Rattoni** por la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo y por el apoyo académico otorgado.*

*Gracias al apoyo de las técnicas académicas *Israela Balderas Moreno* y *Perla Moreno Castilla*.*

*Así como a *Oreste Carbajal* por su excelente trabajo y ayuda.*

Agradecimientos personales

Las palabras nunca son suficientes para plasmar lo agradecidos que podemos estar, en lo personal agradezco a todas las personas que han influido directa o indirectamente en mi vida para que llegara este momento, a mis profesores de la Facultad de Ciencias, a mis profesores del taller, también a mis compañeros.

*A la **Dra. Paola García de la Torre**, por permitirme participar en su proyecto, por todo su apoyo y sus enseñanzas, por su confianza, sus consejos e infinita paciencia.*

A la Dra. Pilar Durán, a la Dra. Rocío Salceda y Biól. Pamela Salcedo por su contribución al mejoramiento del presente trabajo.

A mi amiga Erika Gómez por todas las enseñanzas de vida y los buenos momentos juntas.

A mis amigos Melbi y Giovanni por todos los buenos y malos momentos durante la carrera.

A mis compañeros de laboratorio: Julio, Azul, Daniel, Consuelo, Cristina, Mónica, Ernesto, Eduardo, Armando y Kioko, por sus valiosos consejos, su apoyo para realizar este trabajo y los gratos y divertidos momentos.

ÍNDICE

Abreviaturas-----	7
Resumen-----	8
1. Introducción	
1.1 Marco teórico-----	9
1.1.2 Aprendizaje y Memoria a corto y largo plazo-----	11
1.1.3 Participación de múltiples estructuras en la consolidación-----	15
1.1.4 Memoria de reconocimiento de sabores-----	19
1.1.5 Corteza insular-----	22
1.1.6 Hipocampo-----	23
1.1.6.1 Receptores NMDA-----	26
2. Planteamiento del problema-----	28
3. Hipótesis-----	28
4. Objetivo general-----	29
4.1 Objetivos particulares-----	29
5. Método	
5.1 Sujetos-----	29
5.1.2 Diseño experimental-----	30
5.2 Cirugía e inyección-----	30
5.3 Fármacos-----	31
5.4 Inyección antes de la conducta-----	31
5.4.1 Atenuación de la neofobia-----	31
5.5 Inyección antes de la conducta-----	32
5.5.1 Laberinto acuático de Morris (tarea espacial) -----	32
5.6 Histología-----	33
5.7 Análisis estadístico-----	34

6. Resultados	
6.1 Histologías-----	35
6.2 Participación del Hipocampo en la permanencia de la memoria de reconocimiento de sabores-----	40
6.3 Participación de la Corteza Insular en la permanencia de la memoria de reconocimiento de sabores-----	43
6.3.1 CAS con sacarina después de atenuación de la neofobia-----	45
6.4 Participación del Hipocampo en la adquisición de reconocimiento de sabores-----	47
6.4.1 Participación del Hipocampo en Laberinto acuático de Morris-----	48
7. Discusión-----	50
8. Tabla resumen de resultados-----	56
9. Conclusiones-----	57
10. Literatura Citada-----	58

ABREVIATURAS

HC	Hipocampo
CA	Cuernos de Amón
CI	Corteza Insular
NF	Neofobia
LAM	Laberinto acuático de Morris
AN	Atenuación de la Neofobia
CAS	Condicionamiento Aversivo al Sabor
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
NMDARs	Receptores N-metil-D-aspartato
NMDA	N-metil-D- aspartato
VEH	Solución Vehículo
CP	Corteza perirrinal
CE	Corteza entorrinal
MCP	Memoria de corto plazo
MLP	Memoria de largo plazo
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
PKA	Proteína cinasa A
PKMz	Proteína cinasa Mz
MAPK	Proteína cinasa asociada a microtúbulos
CREB-1	Factor de transcripción
AC	Adenilato ciclasa
SAC	Sacarina
LiCl	Cloruro de Litio
NTS	Núcleo del tracto solitario
NPB	Núcleo parabraquial
AMI	Amígdala
Ace	Amígdala central
ABL	Amígdala basolateral
VPM	Núcleo del tálamo ventral posteromedial
VPL	Núcleo del tálamo ventral posterior lateral
NBM	Núcleo basalis magnocelular
TTX	Tetrodoxina
NaCl	Cloruro de sodio

Resumen

El período inicial en la formación de una memoria expresa un paso sensible que es la consolidación y ésta se refiere a la estabilización progresiva de un trazo recién adquirido y a su vez depende de los procesos internos que aseguren que esta información pueda ser recuperada. Este proceso implica una estabilización de las modificaciones sinápticas después de la experiencia del aprendizaje, independientemente del sistema cerebral que esté implicado. Con el tiempo y la experiencia, los recuerdos experimentan un proceso de reorganización que involucra diferentes redes neuronales, es decir, pasan a un segundo nivel de consolidación conocido como consolidación de sistemas, el cual se trata de un proceso más prolongado e implica la reorganización progresiva de algunas estructuras del cerebro.

El hipocampo es la región principal implicada en este tipo de consolidación, la teoría de consolidación propone que existe una transferencia de los nuevos conocimientos adquiridos desde el hipocampo hacia áreas corticales. Se sabe que el hipocampo está implicado en el procesamiento y almacenamiento de la memoria y navegación espacial, información contextual relacionada con el estímulo y en el almacenamiento de la memoria de sabores seguros. Además, otra estructura que está relacionada con el procesamiento y almacenamiento de la memoria gustativa y que participa en la consolidación de tareas de memoria como el condicionamiento aversivo al sabor (CAS) y la atenuación de la neofobia es la corteza insular. Sin embargo, hasta el momento no existen datos que aporten evidencia acerca del papel que juegan estas estructuras en la permanencia de la memoria a largo plazo.

En este trabajo se analizó el efecto de la inactivación en el hipocampo o la corteza insular después de la consolidación de la memoria de reconocimiento de sabores, empleando la tarea de atenuación de la neofobia, por medio de inyecciones intracerebrales de NMDA.

Los resultados indicaron que no hubo ningún efecto cuando se inactivó el hipocampo mediante inyecciones de NMDA después de la consolidación de la tarea de atenuación de la neofobia y tampoco hubo efecto cuando se inactivó esta estructura antes de la atenuación de la neofobia lo cual sugiere para el primer caso que no existe participación del hipocampo en la permanencia a largo plazo de la memoria de sabores seguros, se propone que esto es debido a que el trazo previamente adquirido y consolidado se volvió independiente de dicha estructura; además se sugiere la participación de otras estructuras en compensación del hipocampo inactivado. Se sabe que el hipocampo está conectado directa e indirectamente vía corteza entorrinal (CE) con la corteza perirrinal (CP), por lo tanto se sugiere la participación de esta estructura.

En cuanto a la corteza insular la inactivación de esta estructura mediante inyecciones de NMDA después de la adquisición y consolidación de la atenuación de la neofobia si hubo efecto sobre el trazo de memoria previamente adquirido, por lo que se propone que existe participación en la permanencia a largo plazo de la memoria de sabores seguros de esta estructura.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Marco teórico

Las primeras especulaciones acerca de la memoria humana se remontan a los antiguos filósofos griegos, principalmente Aristóteles, quien estudiaba la memoria por medio de introspección, análisis lógico y argumentación (Squire y Kandel, 2009). Fue hasta el siglo XIX que el estudio de los procesos relativos a la memoria adquirió características de ciencia experimental en lugar de filosóficas. Esta transición se inició en 1885 con el trabajo titulado *Über das Gedächtnis* (sobre la memoria) del científico alemán Hermann Ebbinghaus, en el que aplica el método científico, realizando experimentos en el laboratorio sobre memoria en condiciones controladas. Este trabajo contenía el primer análisis sistemático de la memoria humana por medio de la experimentación con un sistema de memorización de sílabas sin sentido (trigramas consonante-vocal-consonante), con el propósito de analizar cuánta información se podía recordar a través del tiempo (Anderson, 1995; Ballesteros, 1999; Squire y Kandel 2009).

Con dichos experimentos comprobó que la memoria se establecía gradualmente, ya que había una correlación directa entre un mayor número de repasos y la cantidad de sílabas recordadas. También descubrió que había un número máximo de sílabas que podían ser recordadas después de haber repasado sólo una vez la lista de sílabas, con lo cual anticipó una de las divisiones fundamentales de la memoria: de corto y largo plazo (Fig.1). Posteriormente el filósofo William James en 1890 nombró a estas memorias que duran minutos u horas “memoria de corto plazo” (MCP) en la cual no es necesario evocar la información porque ésta nunca abandona el curso principal del pensamiento y “memoria de largo plazo” (MLP), en la que la información ya no ocupa nuestra atención y dejamos de estar conscientes de ella, pero podemos recuperarla a voluntad cuando lo necesitemos (Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001).

Georg Müller y Alfons Pilzecker sugirieron que la memoria a largo plazo se consolida con el tiempo, en otras palabras se vuelve “resistente a la interferencia”, teniendo como consecuencia una visión más extensa acerca del paso de las memorias lábiles a memorias estables mediante el proceso de consolidación. (Squire y Kandel, 2009).

A mediados del siglo XIX la psicología conductual poseía más fuerza, Charles Darwin sugirió que de la misma manera en que existen características morfológicas continuas en las especies, las características mentales son similares y de esa manera se podrían utilizar animales para el estudio y la comprensión de las nuestras. Basados en lo anterior el fisiólogo ruso Iván Pavlov y el norteamericano Edward Thorndike desarrollaron modelos animales para el estudio del aprendizaje, lo que condujo a Pavlov a descubrir el condicionamiento clásico y a Thorndike a descubrir el

condicionamiento operante. Estos eventos impulsaron el uso de animales como modelos para estudios de aprendizaje y memoria (Squire y Kandel, 2009).

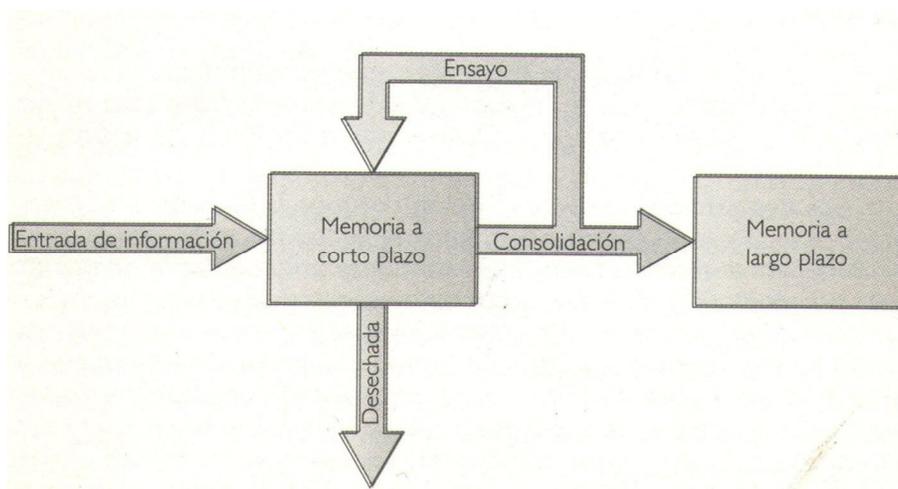


Fig. 1 Modelo propuesto por Atkinson y Shiffrin en el que se relacionan la memoria de corto y largo plazo (Modificado de Bermúdez-Rattoni y Prado 2001).

Más adelante, Karl Lashley psicofisiólogo norteamericano del siglo XX trató de responder la incógnita de dónde se almacena la memoria, por medio del entrenamiento de ratas para que aprendieran a salir de un laberinto, posteriormente retiraba diferentes áreas de la corteza cerebral y volvía a colocar a las ratas en el laberinto para observar cuánto del aprendizaje se había mantenido. Descubrió que el déficit en el desempeño estaba correlacionado con el tamaño del área cortical perdida, pero no con una localización específica, con lo cual se demostró que no existe una sola área central en el cerebro en la que se almacena la memoria (Goodwin, 2008).

Para explicar los resultados de Lashley, en 1949 Donald Hebb en su publicación *The Organization of Behavior* propuso que redes de células trabajan juntas para representar información y que estos conjuntos se encuentran distribuidos en grandes áreas de la corteza, proponiendo con esto que la memoria no se almacena en un solo centro sino que se encuentra distribuida en diferentes estructuras del sistema nervioso (Milner *et al*, 1998).

En 1957 Brenda Milner describió el caso del paciente Henry Gustav Molaison (HM iniciales del paciente), con lo cual aportó evidencias acerca de la participación de diferentes estructuras en el proceso de consolidación, cuando la memoria pasa de corto a largo plazo. Este paciente padecía epilepsia severa y como tratamiento se le retiraron estructuras mediales del lóbulo temporal; esto le trajo como consecuencia la incapacidad de almacenar nueva información

(amnesia anterógrada). El paciente podía registrar información perceptual de manera adecuada, sin embargo no podía retenerla por más de 40 segundos. Otras pruebas demostraron que su habilidad sensorial visual podía mejorar a pesar de que no recordara ni estuviera familiarizado con la tarea aplicada, además el paciente podía recordar todos los eventos previos a la intervención quirúrgica. Con esto se demostró que existen diferentes sistemas mnemónicos en el cerebro, afectándose únicamente la memoria a largo plazo (amnesia anterógrada), en conjunto con amnesia retrógrada (gradiente temporal). Entre las estructuras que fueron removidas al paciente están la amígdala, el giro hipocampal anterior y parte del hipocampo (Milner *et al*, 1998; Hawkins *et al*, 2006; Peña-Casanova, 2007, Dewer, *et al.*, 2001).

Este trabajo demostró también que existen diferentes sistemas de memoria, uno de ellos no depende del lóbulo medial y la memoria se adquiere con la repetición de una tarea expresándola a través del desempeño pero sin evocarla conscientemente, este tipo de memoria se conoce como memoria “no declarativa” o “implícita” y se refiere a “saber cómo”. El otro sistema de memoria se conoce como memoria “declarativa” o “explícita” y se refleja al recordar hechos y eventos refiriéndose al “saber qué, cuándo y dónde” (Milner *et al*, 1998).

1.2 Aprendizaje y memoria a corto y largo plazo.

Para que una especie sobreviva en su entorno debe adoptar las conductas de comportamiento adecuadas a su hábitat; estas conductas o comportamientos se obtienen mediante la evolución y el aprendizaje (Anderson, 2001).

El aprendizaje y la memoria son propiedades del sistema nervioso que nos permiten adquirir, retener y evocar diferentes tipos de información. De acuerdo al sistema clasificación de memoria de Tulving (1985), un sistema de memoria se define como la interacción entre los mecanismos de adquisición, retención y evocación (Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001).

El aprendizaje es la capacidad de adquirir conocimiento y comúnmente da como resultado cambios en la conducta y puede clasificarse como aprendizaje no asociativo, en donde se encuentran los fenómenos de habituación y sensibilización; aprendizaje asociativo en el cual los organismos aprenden las relaciones entre eventos, estímulos o conductas y el aprendizaje incidental o de procesos relacionados, donde el aprendizaje es estudiado como cambios adaptativos debidos a las entradas incidentales de información, en éste aprendizaje el organismo no identifica lo que está aprendiendo, sin embargo lo refleja conductualmente (Dudai, 1989).

Al proceso por el cual el aprendizaje es codificado, almacenado y evocado a lo largo del tiempo se le denomina memoria (Kandel *et al*, 2000).

El aprendizaje le permite a los organismos demostrar la información adquirida dentro del ambiente en el que se desarrollan y a la memoria llevar un registro de la experiencia. Y de esta última dependen los cambios en nuestro comportamiento obtenidos del aprendizaje en experiencias previas y esto a su vez nos lleva a la supervivencia a las condiciones de un medio (Anderson, 2001).

En la actualidad la clasificación de memoria para mamíferos más empleada es la de Larry Squire. La cual se basa en el análisis de los daños en los sistemas de memorias como consecuencia de lesiones en pacientes con padecimientos neurológicos (Fig. 2). Kandel sugiere que tanto en la memoria implícita como en la explícita, hay etapas que son codificadas como cambios en la fuerza sináptica y que se correlacionan con las fases del comportamiento en la memoria a corto y largo plazo (Kandel, 2001).

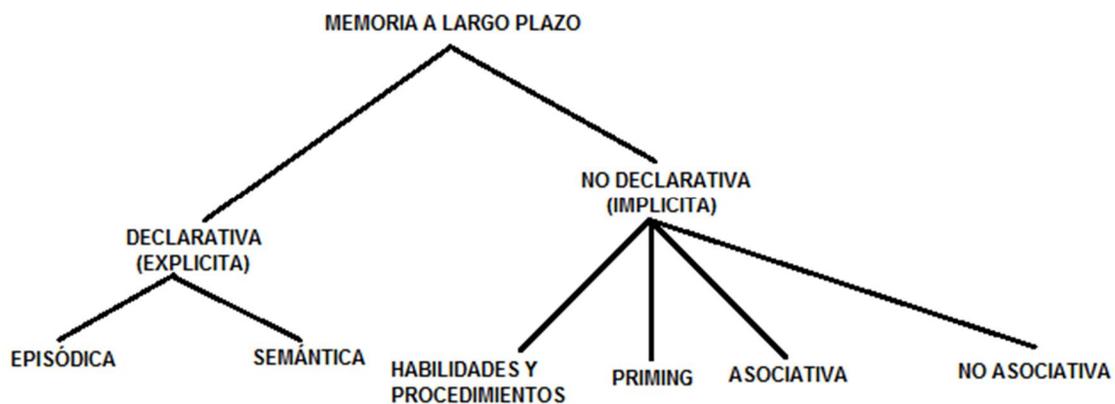


Fig. 2 Sistemas de memoria en mamíferos según Squire (Modificado de Milner *et al*, 1998).

La memoria es un fenómeno complejo y diverso por lo tanto no se puede estudiar como un todo, ésta tiene que fraccionarse. De este fraccionamiento viene el concepto de sistemas de memoria (Fernández y Bermúdez- Rattoni, 2001).

La adquisición es la entrada de nueva información que será procesada (Kesner y Rogers, 2004). La consolidación se refiere al proceso mediante el cual se almacena la memoria a largo plazo y es dependiente de síntesis de proteínas (Mc Gaugh, 2000). La evocación, resulta en la expresión de la conducta por la experiencia e implica la recuperación de la información almacenada (Baddeley, 1999).

El lóbulo temporal medial ha sido relacionado con la formación, consolidación y recuperación de la memoria, mientras que las áreas corticales han sido asociadas principalmente con el almacenamiento a largo plazo de procesos de control cognoscitivos (Squire y Kandel, 2009).

Inmediatamente después del aprendizaje existe un intervalo de tiempo muy breve en el que los procesos de señalización molecular, como la expresión de factores de transcripción tempranos y los genes de expresión temprana, son susceptibles de ser interrumpidos. Este proceso, llamado consolidación, es dependiente de síntesis de proteínas, por lo tanto se puede afectar la consolidación de la memoria a largo plazo por medio de inhibidores de la síntesis de proteínas durante este período de tiempo (Davis y Squire 1984; Dudai 2004). La consolidación celular o sináptica se refiere a la cascada de modificaciones postraduccionales de las proteínas sinápticas, la activación de factores de transcripción, la modulación de la expresión génica en la sinapsis y el cuerpo celular, así como la reorganización de las proteínas sinápticas, que termina con la remodelación sináptica, todo esto con el fin de hacer un trazo estable de la memoria (Dudai, 2004).

Se ha demostrado además que una memoria puede pasar por un estado lábil en el cual puede ser perturbada o desplazada por la entrada de nueva información al sistema (Squire y Kandel, 2009).

Erick Kandel y James Schwartz encontraron que cambios sinápticos en el comportamiento a corto plazo eran expresados incluso cuando la síntesis de proteínas era inhibida. Esto sugirió que la plasticidad sináptica a corto plazo podía ser mediada por un sistema de segundos mensajeros como el de la adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Kandel, 2001).

Kandel propuso también, que durante el almacenamiento de la MLP una estrecha cascada de genes de activación es encendida y contralada con genes supresores de la memoria, que proveen un umbral o punto de control para el almacenamiento de una memoria, presumiblemente para asegurar que sólo las características más sobresalientes sean aprendidas. Los supresores de memoria permiten la modulación de la memoria de almacenamiento por estímulos emocionales, como ocurre en "recuerdos flashbulb", que son recuerdos de acontecimientos con una carga emocional que pueden ser evocados a detalle.

Por lo tanto la MCP fue considerada como un sistema de almacenamiento temporal que contendría una cantidad reducida de información (Kandel, 2001), mientras que la MLP fue considerada como un depósito de conocimiento más permanente, sin ninguna limitación aparente de capacidad (Fig. 3) (Anderson, 2001).

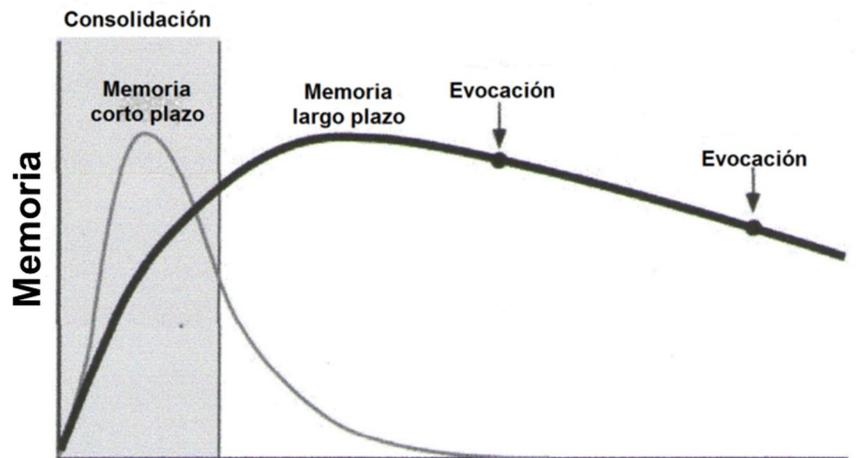


Fig.3 Fases de la memoria (Modificado de Dudai *et al*, 2004).

Para el almacenamiento de la MCP, ya sea memoria implícita o explícita, se requiere de diferentes vías de señalización. Los cambios de la sinapsis a corto plazo involucran modificaciones postraduccionales de proteínas, que conducen a modificaciones de conexiones sinápticas preexistentes (Kandel, 2001).

Cuando la información llega a través de las entradas sensoriales, se liberan diferentes transmisores dependiendo del estímulo en particular y de la estructura cerebral que participa, de esta manera se activan canales que permiten el paso de iones y esto genera diversas cascadas de segundos mensajeros. Dentro de los mecanismos involucrados en la MCP se encuentra la fosforilación a través de cinasas; la activación de estas enzimas produce cambios transitorios de corta duración en la fosforilación de canales iónicos, receptores, enzimas y proteínas del citoesqueleto (Micheau y Riedel, 1999).

Los cambios sinápticos a largo plazo involucran la activación de genes de expresión temprana, síntesis de proteínas y la formación de nuevas conexiones. El almacenamiento de la memoria a largo plazo para la memoria explícita e implícita, requiere una vía de señalización donde participan además de muchas otras moléculas, proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa asociada a microtúbulos (MAPK) y factor de transcripción CREB-1 (por sus siglas en inglés "CAMP responsive element binding protein 1"), ésta última se localiza en el núcleo (Kandel, 2001).

La MLP requiere de síntesis de proteínas (Squire, 1987). Esto se lleva a cabo mediante la activación de segundos mensajeros, por ejemplo, la adenilato ciclasa (AC) que aumenta los niveles de (AMPc). El aumento de AMPc hace que la PKA se active. A continuación el factor de la transcripción dependiente de AMPc (CREB), se activa, la fosforilación de CREB promueve el reclutamiento de coactivadores transcripcionales que inducen la transcripción de genes de

expresión inmediata, los cuales activan la transcripción de genes de expresión tardía. Por consiguiente la transcripción y la traducción en la sinapsis modifica la configuración de la misma, insertando nuevos receptores y modificando la liberación de neurotransmisores (Dudai, 2002).

1.3 Participación de múltiples estructuras en la consolidación

Para que la información adquirida pueda perdurar a través del tiempo en el cerebro se requiere de un evento conocido como consolidación, el cual expresa un paso sensible en la formación de una memoria; se refiere a la estabilización progresiva de un trazo recién adquirido y a su vez depende de los procesos internos que aseguren que esta información pueda ser recuperada. Este proceso implica una estabilización de las modificaciones sinápticas después de la experiencia del aprendizaje, independientemente del sistema cerebral que esté implicado (Dudai, 1996).

Se cree que los recuerdos pasan a un segundo nivel de consolidación determinado conocido como consolidación de sistemas, el cual se trata de un proceso más prolongado e implica la reorganización progresiva de algunas estructuras del cerebro que ocurre después de la consolidación sináptica (Squire y Kandel, 2009). Este tipo de consolidación fue descrito primero por Ribot que observó que en una lesión en el cerebro o en una enfermedad eran menos afectados los recuerdos remotos de la memoria que los más recientes (Squire y Kandel, 2009).

La teoría de consolidación de sistemas propone que existe una transferencia de los nuevos conocimientos adquiridos desde el hipocampo hacia áreas corticales a través del tiempo, lo cual se refiere a una consolidación en un segundo nivel de la memoria. Existen evidencias que apoyan esta teoría cuando se trata de memorias episódicas, sin embargo también otros tipos de memoria persisten a través del tiempo independientemente de que en un inicio dependan o no del hipocampo.

Los sistemas de consolidación han sido desde entonces evaluados en modelos humanos y animales mediante lesiones o inactivaciones temporales del hipocampo (Anagnostaras *et al*, 1999; Knowlton y Fanselow 1998; Maren *et al*, 1997). En 1992 Kim y Fanselow propusieron una participación temporal del hipocampo, ellos encontraron que inactivando el hipocampo inmediatamente después de la adquisición del contexto pero no del tono pareado en la memoria del miedo, dañaban la retención de la misma. Por otro lado no hubo efectos sobre ésta cuando la lesión era realizada después de un intervalo largo de tiempo posterior a la adquisición. Esto sugiere que el hipocampo juega un papel limitado por el tiempo en el condicionamiento contextual al miedo. De acuerdo con estos estudios posteriormente se planteó que por lo menos cuando se trata de recuerdos episódicos, el hipocampo tiene una participación temporal en el almacenamiento de una memoria (Deweere *et al*, 2001; Milner, 2005).

De manera similar Zola y Squire en 1990 observaron que una lesión del hipocampo de 2 a 4 semanas post-entrenamiento en monos, produjo severos déficits en pruebas de discriminación de objetos pero no así en los monos a los que se les lesionó la misma estructura pero después de 8 a 16 semanas del entrenamiento (Zola-Morgan y Squire 1990). Estos estudios dieron una noción de que los sistemas de consolidación de memoria mediados por el hipocampo ocurren por un período de tiempo limitado (semanas o meses), después del cual las memorias entran a un mayor estado de resistencia a las interferencias y son posiblemente almacenadas en algún lugar de la corteza (Zola-Morgan y Squire, 1990; Kim y Fanselow, 1992; Bontempi *et al*, 1999; Frankland *et al*, 2004).

Existe otra explicación teórica acerca de la interacción entre estructuras, que se basó en casos humanos de amnesia y fue conocida como “El síndrome de desconexión”. Con estos datos se pudieron explicar los casos de amnesia retrógrada en los que algunas estructuras dañadas del sistema de recuperación, formado por la corteza temporal ventrolateral prefrontal, anterolateral y sus interconexiones (componentes de este sistema que pueden tener además otras implicaciones); que se pensaba participaban en la recuperación provocaban deterioro de la memoria, esto aun cuando las estructuras de almacenamiento original no fueran tocadas. En este trabajo se establecieron las siguientes hipótesis; tanto la amnesia anterógrada como la retrógrada constituyen síndromes de desconexión, el daño combinado de las regiones del lóbulo temporal lateroventral, prefrontal y anterolateral constituyen el principal objetivo para que ocurra la amnesia retrógrada; los hemisferios derecho e izquierdo son responsables de la recuperación de diferentes tipos de información. Asimismo plantea que cuando además de varios eventos de recuperación o aspectos de este tipo de eventos están en una rivalidad temporal directa entonces, la supervisión y guía paralela y serial es obligada, por consiguiente un mayor número de regiones en el cerebro serán por lo general ocupadas simultáneamente, por lo cual las estructuras que coordinan esta información recuperada tienen un rol especial. Si tal coordinación de módulos o redes de conexiones es interrumpida por daño focal al cerebro la probabilidad de recuperación exitosa decrecerá drásticamente incluso cuando el loci de los engramas no haya sido tocado durante el daño al cerebro y el síndrome de desconexión puede ser la consecuencia (Markowitsh, 1995).

El sistema de consolidación plantea una teoría que sugiere que cuando nueva información es originalmente codificada y registrada, la memoria de este nuevo estímulo, llega a ser retenida en el hipocampo y en la región cortical, las memorias consideradas como nuevas y que son originalmente dependientes del hipocampo se transforman en memorias remotas en redes corticales y se vuelven independientes de hipocampo (Frankland y Bontempi, 2005). Un ejemplo es el estudio de Squire y Zola que hicieron en el 2000, en el que observan un déficit en la memoria de reconocimiento de objetos reciente pero no en la memoria remota, al lesionar de manera

bilateral la formación hipocampal en monos entrenados para desplazar objetos que cubrían los contenedores de alimentos (Zola *et al*, 2000).

Diversas teorías han sido propuestas para explicar esta múltiple participación de estructuras en la MLP. Como ejemplo están los autores Nadel y Moscovitch, quienes revisaron un trazo múltiple, que plantea que la retención y la recuperación detallada de memorias autobiográficas dependen del sistema hipocampal, sin importar cuánto tiempo antes haya sido adquirida esta información (Nadel y Moscovitch, 1997). Por otro lado, en los recuerdos de la memoria semántica también existe contribución durante algún tiempo por parte del sistema hipocampal, antes de que la memoria pueda ser recuperada de forma independiente. Sin embargo, recuerdos de la memoria semántica pueden tener elementos episódicos asociados a ellos que continúen almacenados en el hipocampo a los que llamamos dependientes del hipocampo, estos se distinguen en recuerdos espaciales detallados obtenidos por experiencia (memoria episódica) y recuerdos esquemáticos (memoria semántica) que son suficientes para la navegación pero no para la re-experimentación del medio ambiente en el cual estos fueron adquiridos; en la memoria episódica y semántica el primer tipo de memoria espacial es dependiente del hipocampo sin importar cuánto tiempo atrás fue adquirido, sin embargo el último puede sobrevivir o mantenerse independientemente del hipocampo y entonces es representado en estructuras extra-hipocampales (Nadel *et al*, 2000; Moscovitch *et al*, 2005).

Además se ha reportado que la actividad metabólica en el hipocampo es más alta durante la consolidación, sin embargo la actividad cortical también ha sido detectada aunque con menor intensidad. Estos patrones de actividad se invierten cuando la memoria reciente llega a ser memoria remota, sugiriendo con esto la participación de todas las estructuras en todo momento, pero con diferente relación de tiempo-fuerza, y no proponen una real independencia del hipocampo o una transferencia del trazo a áreas corticales (Bontempi *et al*, 1999).

Adicionalmente Cui y colaboradores puntualizaron una participación temporal de los receptores de NMDA en el prosencéfalo para las memorias dependientes e independientes del hipocampo después de la consolidación, con el fin de ser recuperado después de un período de tiempo de 9 meses posterior a la tarea de aprendizaje. Ellos propusieron este mecanismo como un requerimiento general para un almacenamiento permanente de memorias remotas en el cerebro (Cui *et al*, 2004).

Por otra parte, Dash propone la “teoría C” que se refiere al sistema de consolidación y en la cual postula que la memoria es almacenada simultáneamente en áreas hipocampales y neocorticales y quizás en otras estructuras no hipocampales, como resultado del aprendizaje. El hipocampo juega el papel de coordinador inicial para la recuperación de la memoria hasta que

conexiones extra hipocampales hayan desarrollado la capacidad para hacerse cargo de este papel. El evento que define el período de dependencia del hipocampo es el tiempo de transporte que les toma a las proteínas viajar a través las conexiones extrahipocampales desde el soma a sitios sinápticos específicos. Información espacial específica y características relacionadas con ésta permanecen almacenadas en el complejo hipocampal incluso después del período de consolidación (Dash *et al*, 2004).

Más adelante, Morris, planteó tres hipótesis de cómo tiene lugar la persistencia de la memoria. Una de ellas, la más importante para nuestro trabajo sugiere que la persistencia de la memoria no tiene que ser determinada en el momento inicial de la formación del trazo de memoria, sino que depende de la activación neural en la cual ocurren cambios sinápticos (Morris, 2006). Previamente Frey y Morris (1997) encontraron que el mantenimiento de la LTP (potenciación a largo plazo) que es el principal mecanismo celular que subyace a la memoria, depende principalmente de la actividad de la neurona y no sólo de los eventos locales que ocurren en su inducción.

Existe evidencia de la participación de más de una estructura durante la codificación y recuperación tanto para las memorias dependientes del hipocampo (Bontempi *et al*, 1999) como para las independientes del hipocampo (Garcia-DeLaTorre *et al*, 2009). Cuando una tarea es esencialmente dependiente del hipocampo durante el aprendizaje, lesiones de esta estructura perturban por igual a la memoria reciente y remota (Nadel y Moscovitch, 1997).

Estos trabajos sugieren la participación de diversas moléculas y estructuras que permiten la consolidación y la permanencia de la memoria en el cerebro a largo plazo en los diferentes tipos de memorias, esta permanencia de la información adquirida a través del tiempo es la característica más relevante de la memoria, junto con la posibilidad de que esta información pueda ser recuperada de esta memoria previamente consolidada.

Se podría asumir también la participación de diversas estructuras cerebrales para una misma memoria y que además algunas de estas mismas estructuras lleguen a activarse cuando la memoria sea evocada, además se sugiere que todas las estructuras involucradas en la recuperación o en la expresión de un trazo de memoria son parte de su estabilidad.

1.4 Memoria de reconocimiento de sabores

Los animales han desarrollado y perfeccionado habilidades de supervivencia a lo largo de su evolución en el planeta, quizás una de las más importantes o útiles, sea la habilidad para memorizar sabores seguros, esta memoria les permite recordar sabores que han probado previamente.

La característica que define este aprendizaje es la asociación formada entre los estados viscerales (señalados a través de aferencias viscerales) y estímulos externos (mediados por aferencias gustativas, olfativas, visuales o somatosensoriales) (Bures, 1998).

En el caso de la alimentación, cuando un animal descubre un sabor nuevo la conducta normal es una reducción en el consumo del mismo, esta respuesta es llamada neofobia (NF). Si el nuevo sabor no tiene consecuencias adversas para el animal, en posteriores ocasiones de exposición al sabor, incrementará su consumo y etiquetará al sabor como seguro, este proceso es conocido como atenuación de la neofobia (AN). Por el contrario, si el consumir este nuevo sabor le trae como consecuencia malestar al animal, este sabor será etiquetado como no seguro, desarrollando una aversión de larga duración y el animal evitará consumirlo nuevamente. Este proceso es conocido como condicionamiento de aversión a los sabores cuando se realiza en un ambiente controlado (CAS), Fig. 4 (Bermúdez-Rattoni, 2004).

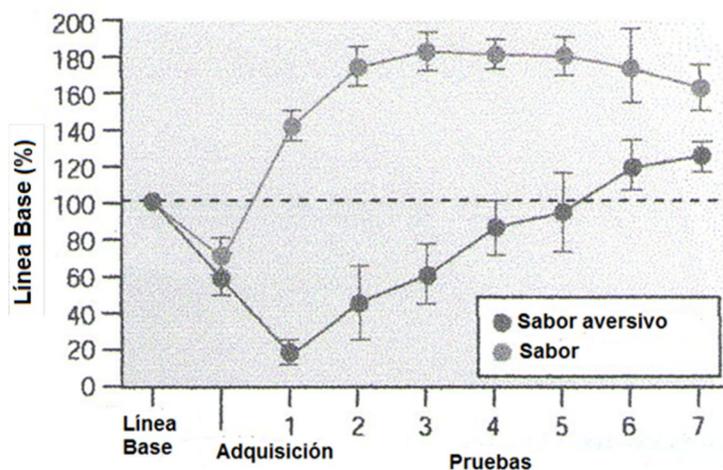


Fig. 4 Gráfica de sabores de seguro y aversivo. (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

John García describió en 1995 el paradigma conductual del CAS, su trabajo consistió en exponer a las ratas a rayos gamma, los cuales les causaban malestar gastrointestinal, mientras éstas bebían agua con un sabor específico (sacarina). Cuando a las ratas se les presentó nuevamente ese sabor disminuyeron su consumo, lo cual reflejó aversión al sabor (García *et al.*, 1995).

En la actualidad esto se conoce como condicionamiento aversivo al sabor, en el cual se asocia un sabor como estímulo condicionado (EC) y se provoca un malestar gástrico que actúa como el estímulo incondicionado (EI), el sabor sigue siendo sacarina (EC), pero el malestar gástrico (EI) ahora es una inyección intraperitoneal de Cloruro de Litio (LiCl), Fig.5.

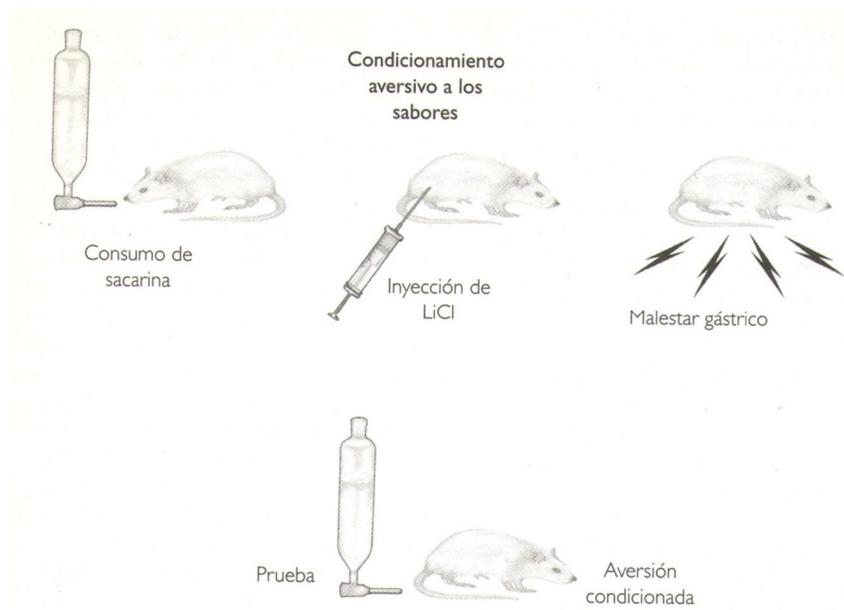


Fig 5. Condicionamiento aversivo a los sabores (Modificado de Bermúdez-Rattoni y Prado 2001).

El CAS ha sido muy utilizado en roedores como un paradigma de aprendizaje y memoria (Welzl *et al.*, 2001), debido a que presenta una rápida adquisición, sólo se requiere de un apareamiento entre el EC y el EI para ver a largo plazo los efectos conductuales. Además el CAS permite tener una visión clara del tiempo en el cual se pueden identificar señales neuronales, esto debido a que el aprendizaje es fuerte y duradero. Permitiendo conocer de manera amplia las estructuras cerebrales, implicadas en este aprendizaje (Yamamoto *et al.*, 1998).

La memoria segura y la aversiva dependen de una representación neural del sabor, llamada trazo de memoria del sabor, esta representación puede ser procesada en paralelo en diversas regiones cerebrales cambiando su dirección hacia seguro o aversivo, dependiendo de las consecuencias del consumo del sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004).

Los sustratos neurales del CAS se han estudiado a través de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas, anatómicas y de lesiones cerebrales y se ha obtenido la siguiente descripción 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, al hipotálamo lateral, al núcleo cama de la estría terminallis, a la amígdala central (Ace) y a la amígdala basolateral (ABL) (Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998).

Existen al menos dos vías por medio de las cuáles el estímulo que provoca el malestar llega al sistema nervioso central. El núcleo del tracto solitario caudal recibe proyecciones de las ramas hepáticas del nervio vago, que son sensibles a irritación gástrica, y del área postrema, que es sensible a toxinas en la sangre; las proyecciones del núcleo del tracto solitario llegan al núcleo parabraquial externo lateral, la amígdala central y el núcleo hipotalámico paraventricular. De la porción lateral del núcleo parabraquial existen proyecciones a la parte ventral posterolateral del tálamo, que junto con la amígdala central presenta eferencias hacia la corteza insular (CI) (Fig. 6) (Bermúdez-Rattoni, 2004).

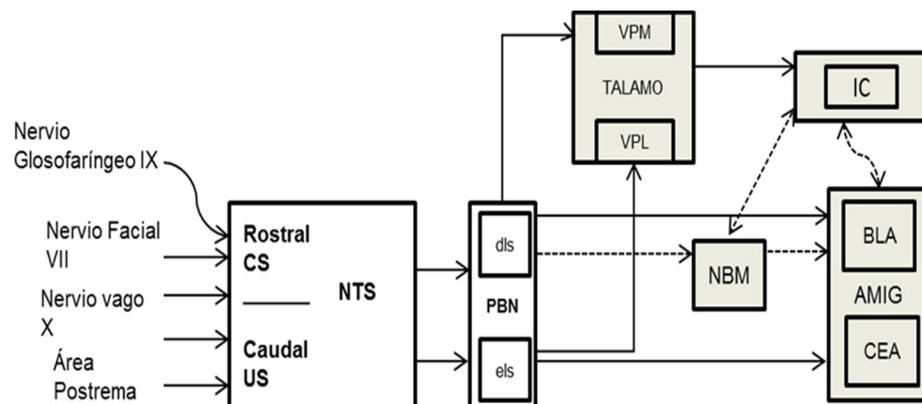


Fig. 6 Vías de procesamiento del estímulo gustativo. CS, estímulo condicionado; US, estímulo incondicionado; NTS, núcleo del tracto solitario; dls, sub-núcleo dorsolateral; els, sub-núcleo exterior lateral; VPM, núcleo del tálamo ventral posteromedial; VPL, núcleo del tálamo ventral posterior lateral; NBM, núcleo basal magnocelular; IC, corteza insular; AMI, amígdala; BLA, amígdala basolateral; CEA, amígdala central (Modificado de Bermudez-Rattoni, 2004).

Las vías viscerales y gustativas convergen en varias estructuras cerebrales, donde el malestar y el sabor son asociados para crear lo que posteriormente será un trazo de memoria (Bermúdez-Rattoni, 2004).

1.5 Corteza insular

Existe evidencia que relaciona a la CI con el procesamiento y almacenamiento de la memoria gustativa, también se le conoce como corteza visceral, ya que recibe información de tipo gustativa y conexiones del tálamo, aunque sus principales conexiones provengan del sistema límbico, y son aferencias de la amígdala. En la rata, la corteza insular se encuentra ubicada en la superficie lateral del cerebro: está delimitada por un área que abarca la corteza frontal y la corteza perirrinal en dirección al rostro caudal, en su parte ventral va desde la corteza somatosensorial hasta la periforme (Bures, 1998).

Esta corteza en la rata, además de encargarse del procesamiento de información gustativa, también está relacionada con la consolidación de tareas de memoria como el CAS y la atenuación de la neofobia (Bermúdez-Rattoni, 2004).

La CI recibe proyecciones colinérgicas y GABAérgicas del núcleo basalis magnocelularis; también recibe proyecciones glutamatérgicas del sistema límbico incluyendo a la amígdala y el núcleo mediodorsal del tálamo y de la corteza prefrontal (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991).

La CI está involucrada en reacciones viscerales, estrés y procesos de aprendizaje y memoria bajo diferentes modelos de estudio, como la prevención pasiva (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991), laberinto acuático de Morris (Gutierrez *et al.*, 1999) y CAS (Bermúdez-Rattoni, 2004). En el reconocimiento de sabores, estudios electrofisiológicos demuestran que la CI presenta características diferenciales en cuanto a estimulación mediante un determinado sabor. Las neuronas estimuladas con un sabor dulce se encuentran en la parte rostral, y con quinina en la región caudal y la región granular. Esto sugiere que la CI es la región responsable de la percepción gustativa, que además puede recibir otro tipo de información sensorial, lo anterior hace que la CI se considere una estructura multimodal en la que se procesan las señales sensoriales (Yamamoto *et al.*, 1989).

Particularmente se ha demostrado que la CI es importante para la adquisición de la memoria gustativa de aversión (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Escobar y Bermúdez-Rattoni, 2000), ya que existen trabajos donde se inactiva temporalmente esta estructura por medio de un bloqueador de canales de sodio sensibles a voltaje, la tetrodoxina (TTX) antes de la adquisición de

la tarea, impidiendo así la formación del CAS (Gallo *et al.*, 1992). Existe otro trabajo en el que se interrumpe la adquisición y evocación del CAS mediante lesiones en la CI con inyecciones de NMDA (Ramírez-Amaya *et al.*, 1998).

Además Stehberg and Simon (2010) encontraron que la CI tiene una participación independiente del tiempo en la memoria de aversión al sabor. Ellos describen una completa disrupción de la memoria cuando lesionaron la CI después de una o seis semanas de la adquisición del CAS. Al respecto, también se sabe que la inactivación de la fosforilación de la proteína cinasa Mz (PKMz) en la CI después de la consolidación del CAS (hasta un mes después de la adquisición), afecta la persistencia de MLP pero no su adquisición (Shema *et al.*, 2007).

1.6 Hipocampo

El hipocampo (HC) forma parte del sistema límbico y es una estructura localizada dentro del lóbulo temporal, se considera una estructura que forma parte de la corteza primitiva (Martin y Clark, 2007).

El hipocampo incluye las regiones cuernos de Amón (CA) y el giro dentado (fig 7). La formación hipocámpal incluye el hipocampo y también incorpora el subículo; el complejo hipocampo además incluye la región parahipocámpal la cual incorpora la corteza entorrinal, perirrinal y la parahipocámpal (Moscovitch *et al.*, 2005). El hipocampo recibe información sensorial polimodal por medio de la corteza entorrinal y posee conectividad aferente y eferente con estructuras subcorticales y corticales frontales (Martin y Clark, 2007).

Se ha establecido que el hipocampo contiene una representación celular del espacio, un mapa cognitivo del espacio y que lesiones a ésta estructura interfieren con tareas espaciales (Kandel, 2001). En 1972, Terje Lomo y Tim Bliss descubrieron que la vía perforante, una vía importante dentro del hipocampo, exhibía plasticidad dependiente de actividad, un cambio llamado potenciación a largo plazo (LTP) (Kandel, 2001).

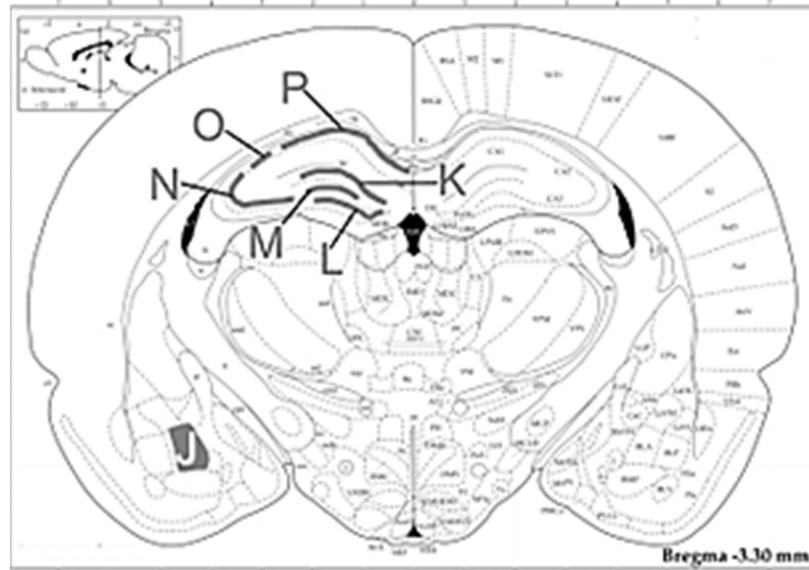


Fig.7 Regiones del Hipocampo. J: amígdala basolateral; K: hoja suprapiramidal del giro dentado (Supra DG); L: hoja infrapiramidal del giro dentado (Infra DG); M: CA4; N: CA3; O: CA2; P: CA1 (Modificado de VanElzakker, M.B. et al, 2011).

En la región CA1 del hipocampo, el LTP es inducido post-sinápticamente por activación de un receptor NMDA para glutamato. A finales de 1980 Richard Morris descubrió que bloqueando farmacológicamente el receptor NMDA no sólo interfería con el LTP sino también bloqueaba el almacenamiento de la memoria. Basados en lo anterior Kandel y colaboradores bloquearon farmacológicamente el LTP con un antagonista del receptor NMDA. Cuando pusieron a los animales en un nuevo ambiente, los animales con los receptores NMDA bloqueados formaron un buen mapa espacial que fue aún estable una hora después. Sin embargo, a las 24 horas muchas células piramidales no lograron retener la representación del campo que tenían inicialmente. Esto sugiere que la activación de los receptores de NMDA probablemente es un paso en la modificación de la fuerza de la sinapsis requerido para la estabilización a largo plazo de un mapa de células de lugar (Kandel, 2001).

Existe evidencia de que el hipocampo está implicado en el procesamiento y almacenamiento de la memoria y la navegación espacial, ya que el daño en el hipocampo de roedores causa un déficit en el aprendizaje y la memoria en un amplio rango de tareas espaciales (Martin y Clark, 2007).

Se posee información que propone que el hipocampo almacena información contextual relacionada con el estímulo (Balderas *et al.* 2008). Sin embargo, en un sentido más amplio se ha sugerido que otras asociaciones relevantes entre el estímulo pueden ser creadas y almacenadas en el hipocampo (Mayes *et al.*, 2007 en De la Cruz *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que el hipocampo está involucrado en el almacenamiento de la memoria de sabores seguros a largo plazo, ya que al inhibir la síntesis proteica con inyecciones de anisomicina en esta estructura durante la tarea de atenuación de la neofobia, afectan la consolidación. Sin embargo, las mismas inyecciones antes del condicionamiento de aversión al sabor no tienen efecto. Estos efectos sugieren que la síntesis de proteínas en el hipocampo es necesaria para establecer la memoria a largo plazo de sabores seguros, y también abren la posibilidad de otras relaciones entre los elementos de tiempo y espacio además de ser procesado y consolidado en el hipocampo. Estos resultados demuestran que diferentes estructuras dentro del lóbulo medial temporal consolidan características relevantes específicas de la memoria segura y aversiva (Krane, *et al.*, 1976; De la Cruz *et al.*, 2008).

Además de estas evidencias de la participación del hipocampo en la memoria de sabores seguros, se ha sugerido también que el contexto en el que se encuentre el animal es un componente relevante. Gallo y colaboradores en 1992 observaron que el contexto temporal puede ser un importante componente de la memoria de sabores. Diferencias en la hora del día en el cual tuvo lugar la adquisición y las pruebas, afectaron la expresión de la memoria de sabores seguros a largo plazo. Este efecto puede ser mediado por el hipocampo ya que lesiones a esta estructura afectan la función de los efectos del tiempo en la memoria de sabores seguros (Gallo 2005 en De la Cruz *et al.*, 2008).

El hipocampo también participa en la memoria espacial, ésta algunas veces es considerada dentro del contexto de la memoria episódica y raramente en el contexto de memoria semántica ya que parece ser ortogonal a esta categoría. Sin embargo Moscovitch en 2005, dividió la memoria espacial dentro de dos categorías análogas a las de la memoria explícita. Él propuso que esto sería útil para distinguir entre las memorias espaciales que consisten en la percepción espacial detallada de los ambientes conocidos (correspondientes a la memoria episódica autobiográfica), a la de aquellos que consisten en representaciones esquemáticas de la topografía (correspondientes a la memoria semántica). Las representaciones detalladas no sólo consisten de información alocéntrica y egocéntrica acerca de rutas y mapas del ambiente (topografía del ambiente), sino también de la apariencia de los elementos de los cuales ese ambiente está comprendido, esto favorece que se pueda re-vivir ese ambiente mentalmente (Moscovitch *et al.*, 2005).

1.6.1 Receptores NMDA

Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDARs) tienen un rol crítico en la transmisión sináptica excitatoria, plasticidad y excitotoxicidad en el sistema nervioso central (Cull-Candy *et al*, 2001). Son receptores ionotrópicos no selectivos a cationes que permiten la entrada de calcio, sodio y potasio (Siegel *et al*, 1999). Los NMDARs sirven como un detector de coincidencia celular para la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (Cui *et al*, 2004). La coincidencia celular es un proceso por medio del cual una neurona o un circuito neuronal puede codificar información mediante la detección de la ocurrencia de señales simultáneas (página web <http://www.merriam-webster.com/medlineplus/neuroscience>; consulta diciembre, 2012).

Su participación en estos procesos refleja sus características dentro de las cuales están; la presencia de sensibilidad a cambios de voltaje por concentraciones extracelulares de iones de Mg^{2+} , alta permeabilidad al Ca^{2+} y de una cinética de activación/desactivación lenta; estos receptores también muestran sensibilidad a una serie de ligandos y moduladores presentes en la sinapsis: el co-agonista de la glicina debe unirse antes de que los receptores puedan ser activados, esto ocurre mientras niveles fisiológicos de protones impiden la activación de los NMDARs (Fig.9), también el Zn^{2+} extracelular y las poliaminas pueden actuar sobre los receptores modificando su comportamiento (Cull-Candy *et al*, 2001).

Los NMDARs parecen funcionar como un ensamblaje heteromérico compuesto por múltiples subunidades NR1 en combinación con por lo menos un tipo de subunidad NR2. La subunidad NR3 no es una forma funcional del receptor por sí sola, pero puede ensamblarse con el complejo NR1/NR2. Es así como cada una de estas subunidades le confiere distintas propiedades al receptor en mayor o menor medida, gran parte de la importancia funcional atribuida a estos receptores está determinada por la expresión de varias subunidades e isoformas (Cull-Candy *et al*, 2001). Se ha demostrado que los receptores de NMDA en la región hipocampal CA1 están ligados funcionalmente con el aprendizaje espacial dependiente de hipocampo. (Moosgan *et al*, 2005).

Ratones knockout para el receptor NMDA en la región hipocampal CA1, presentan graves déficits en el aprendizaje espacial y no espacial. Por el contrario el restablecimiento genético de las funciones de receptores NMDA resulta en el incremento de la detección de coincidencia sináptica y mejoramiento del aprendizaje y memoria (Cui *et al*, 2004). Asimismo el incremento de la función del receptor NMDA a través de la sobre expresión de NR2B en el procéncéfalo aumenta la retención y acelera la extinción del condicionamiento al miedo con contexto y con claves (Tang *et al*, 1999).

Cui y colaboradores en 2004 sugirieron que se requiere de la presencia continua de estos receptores para el almacenamiento permanente de memorias remotas (independientes de hipocampo) en el cerebro, además de que la reactivación del receptor NMDA es la clave del mecanismo de reforzamiento de re-entrada sináptica de forma dinámica y estable a largo plazo para la preservación de la estabilidad del cerebro (Cui *et al*, 2004).

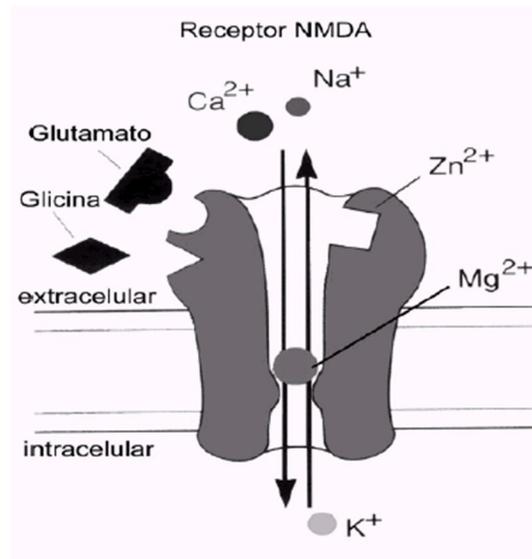


Fig. 9 Receptor NMDA (Modificado de www.encuentros.uma.es/encuentros83/nmda.html; consulta agosto, 12)

2. Planteamiento del problema

El hipocampo (HC) juega un papel importante en diversas tareas de memoria, en la adquisición y consolidación de memorias espaciales, en la formación de la memoria de reconocimiento de objetos en un contexto y recientemente se ha visto que también participa en el reconocimiento de sabores seguros.

La corteza insular (CI), en cambio, está relacionada con el procesamiento y almacenamiento de la memoria gustativa, a ella llega información de tipo gustativa y conexiones del tálamo, sus principales conexiones provienen del sistema límbico, y son aferencias de la amígdala, está relacionada con la consolidación de tareas de memoria como el CAS y la atenuación de la neofobia.

Sin embargo, hasta el momento no existen datos que aporten evidencia acerca del papel que juegan estas estructuras en la permanencia de la memoria a largo plazo. Por ello pretendemos analizar el efecto de la inactivación por medio de inyecciones de NMDA en el HC o CI después de la consolidación de una tarea de reconocimiento de sabores, con el propósito de saber si la información que ya ha sido procesada y consolidada, permanece almacenada a largo plazo en alguna de estas dos estructuras.

3. Hipótesis

El hipocampo participa en la consolidación de la memoria de sabores seguros, pero sólo por un período limitado de tiempo, si después de este período de tiempo se lesiona el hipocampo, la información almacenada no será perturbada, sin embargo, las lesiones a la corteza insular interrumpirán la permanencia de la memoria de reconocimiento de un sabor seguro al ser inactivada post-consolidación.

4. Objetivo General

Evaluar la participación del hipocampo y corteza insular en la permanencia de la memoria de sabores seguros, mediante lesiones con NMDA en estas estructuras.

4.1 Objetivos particulares

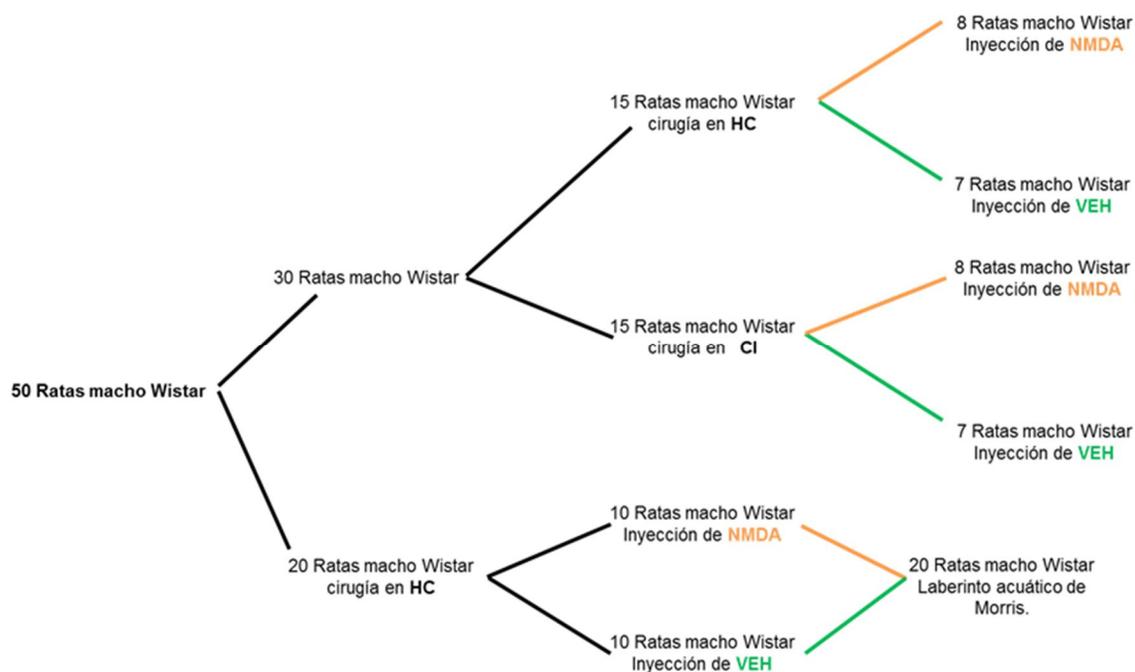
- Analizar el efecto de la inactivación del hipocampo mediante inyecciones de NMDA una vez que la memoria de reconocimiento de sabores seguros ya ha sido consolidada para evaluar su participación en la permanencia de esta memoria.
- Estudiar el efecto de la inactivación de la corteza insular mediante inyecciones de NMDA, en la permanencia de la memoria de reconocimiento de sabores seguros cuando ésta ya ha sido consolidada.

5. MÉTODO

5.1 Sujetos

Se emplearon 50 ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 280g al comenzar el experimento, obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico con alimento y agua *ad libitum* y un ciclo de luz-oscuridad 12h/12h, la fase de luz comenzaba a las 8 am.

5.2.1 Diseño experimental



5.2 Cirugía e inyección

Se utilizó el método estándar de cirugía estereotáxica en el cual se hacen trepanaciones con una fresa dental, posteriormente dentro de estas trepanaciones se introduce un inyector en las coordenadas dirigidas a la estructura blanco, para el hipocampo dorsal fue en las siguientes coordenadas estereotáxicas (mm): Antero-Posterior -3.4, Lateral +/- 1.7, Dorso Ventral -3.7 (Paxinos y Watson 1998). Para la corteza insular: Antero-posterior + 1.2, respecto a Bregma (unión de las suturas de los huesos craneales) Lateral +/-5.5, respecto a la línea media sagital Dorso Ventral -6 respecto a la superficie del cráneo (Paxinos y Watson 1998).

El inyector está conectado a una manguera de polietileno que a su vez está conectada a una jeringa Hamilton de 25µl, la cual se controla por una bomba de inyección automática. Se inyectó 1µl por hemisferio para ambas estructuras a una velocidad de 0.5 µl /min, al terminar este tiempo se dejó el inyector dentro del cerebro un minuto más para permitir la total difusión del fármaco en el tejido.

Para realizar las microinyecciones se anestesió a los animales vía intraperitoneal con pentobarbital sódico 30mg/kg. Al final de las microinyecciones se suturó la herida de las ratas

con una aguja quirúrgica. Después de la cirugía los animales tuvieron un período de recuperación de 7 días con comida y agua *ad libitum*, antes de comenzar con cualquier manipulación conductual.

5.3 Fármacos

Se utilizó como solución vehículo (VEH) un amortiguador de fosfatos (PB) (0.1M, pH 7.4). También se utilizó NMDA (*N*-metil *D*-aspartato), un agonista selectivo de receptores NMDA (de glutamato) a una concentración de 10mg/ml disuelto en PB. Esta concentración se ha utilizado antes para ocasionar lesiones citotóxicas (Ramírez-Amaya *et al.* 1998).

5.4 Inyección después del entrenamiento.

5. 4.1 Atenuación de la neofobia

Se emplearon 30 ratas macho para este experimento, se privó a estos animales de agua por 12 horas. Durante los siguientes tres días se les suministraron 30 ml de agua durante 15 minutos a cada animal por medio de una probeta graduada y un tapón metálico que actúa como bebedero. Se calculó la tasa de consumo base (línea base) de cada animal por medio del registro de los consumos diarios de agua.

Al cuarto día se comenzó con la tarea de atenuación de la neofobia, exponiendo a los animales al consumo de un sabor nuevo (sacarina 0.3%), disuelta en agua, se proporcionó ésta durante 15 minutos por nueve días a cada rata, hasta alcanzar una asíntota de consumo en la que los animales relacionan el sabor como un sabor familiar. Se les colocó agua y alimento *ad libitum*.

Una semana después de haber finalizado la conducta se realizaron las lesiones farmacológicas de las diferentes estructuras a estudiar dividiendo a las 30 ratas en los siguientes grupos: quince ratas operadas en CI las cuales a su vez se dividieron de acuerdo a la inyección con NMDA ocho ratas y con VEH siete ratas, las otras quince ratas restantes se operaron en HIP, de la misma manera que el grupo anterior ocho ratas fueron inyectadas con NMDA y siete con VEH.

Dos semanas más tarde se les volvió a privar de agua por 12 horas, posterior a estas se les dio 30 ml de agua por 15 minutos, registrándose los consumos de cada animal por dos días, los siguientes dos días se les hizo una prueba dándoles a beber sacarina 0.3%, 30 ml por 15 minutos a cada rata y se registraron los consumos.

Dos semanas después de la prueba de atenuación de la neofobia se les volvió a dar línea base de agua por dos días y se les hizo una tarea conductual diferente, esta vez se les hizo condicionamiento aversivo al sabor (CAS); se pesó a cada una de las ratas y se les dio a beber cloruro de sodio (NaCl) 0.1M, se registraron los consumos, 15 minutos después de haberles presentado el sabor se realizó una inyección intraperitoneal a cada rata con cloruro de litio (LiCl) 0.4M en una cantidad ajustada de acuerdo al peso de cada rata, para causar malestar gástrico en cada uno de los animales.

Al día siguiente se les hizo la prueba de memoria del CAS administrándoles nuevamente NaCl 0.1M pero esta vez sin asociarlo al malestar gástrico.

5.5 Inyección antes del entrenamiento.

Para este experimento se emplearon veinte ratas que fueron lesionadas antes de la conducta de atenuación de la neofobia en el hipocampo y se dividieron en dos grupos, un grupo de diez ratas a las que se les inyectó con NMDA y otro grupo de nueve ratas a las que se les inyectó VEH, una rata murió inmediatamente después de la lesión, por lo que se compensó al grupo NMDA con una del grupo VEH, posterior a la cirugía se dejó descansar a los animales por una semana, a continuación de ésta se privó a los animales de agua por 12hrs posterior a éstas se les dio a los animales por dos días 30ml de agua durante 15 minutos (línea base) registrándose los consumos de cada animal; después de estos dos días se les hizo la tarea de atenuación de la neofobia, durante los siguientes cinco días se les presentó un sabor nuevo sacarina 0.3% 30ml por 15 minutos y se registraron los consumos.

Se dejó nuevamente descansar a los animales por una semana, transcurrida ésta se entrenó a las ratas en una tarea de memoria espacial (Laberinto acuático de Morris) dependiente de hipocampo, para comprobar que los animales inyectados con NMDA realmente tuvieron lesionado el hipocampo.

5.5.1 Laberinto acuático de Morris (tarea espacial)

Esta tarea consta de un tanque circular con 1.5 m de diámetro y 1m de altura lleno de agua, la temperatura del agua oscila entre los 20 y 22°C dentro de esta piscina se encuentra sumergida un centímetro en el agua una plataforma cuadrada de 12 cm por lado (Fig 9).



Fig. 10 Laberinto acuático de Morris (Modificado de Sheryl, SM., *et al.* 2007).

El protocolo de entrenamiento consistió en un día de entrenamiento de seis ensayos con una duración de 60 segundos cada uno, durante los cuales las ratas fueron colocadas en un punto de salida diferente y contaba con ese tiempo para encontrar la plataforma y subir en ella y permanecer 30 segundos sobre la plataforma para después tener otros 30 segundos más fuera del tanque para que descansaran entre cada ensayo.

En el caso de los animales que no encontraban la plataforma en los 60 segundos se les guiaba a ésta.

Al día siguiente del entrenamiento se les realizó a estas ratas una prueba de memoria la cual consistió en un sólo ensayo de 60 segundos en el mismo tanque y con la misma plataforma. La memoria se midió con el tiempo en segundos que la rata tardó en encontrar la plataforma.

5.6 Histología

Al finalizar el experimento se realizó la histología correspondiente para corroborar que la inyección intracerebral bilateral de NMDA provocó lesión en el hipocampo o en la corteza insular. Las ratas fueron inyectadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg), posteriormente fueron perfundidas por vía aórtica con solución salina (0.9%). Se les extrajo el cerebro y se colocaron en paraformaldehído al 4% durante 7 días.

Una vez que el tejido se fijó fue lavado y cambiado a una solución de sacarosa primero al 10% y fue variando la concentración 20% y 30%, dejando pasar 24h en cada concentración.

Posteriormente se congelaron y cortaron los cerebros en rebanadas de 30 μ m en un micrótomo, se colocaron en laminillas. Una vez listas se tiñeron empleando la tinción de NISSL, que es una técnica de basofilia como una coloración con hematoxilina. El fundamento de la tinción es el uso de un colorante básico (azul de toluidina, azul de metileno, violeta de cresilo) que, en un medio ácido (pH 3) reacciona con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos. Con esta técnica se tiñen los núcleos de todas las células (neuronas y células gliales) y la sustancia de Nissl (ribosomas libres y asociados a membranas de neuronas). Se utiliza para el estudio de detalles citológicos y citoarquitectónicos; estos tejidos se analizaron al microscopio de luz y se corroboró la lesión del NMDA.

Los cerebros que fueron tratados con NMDA y no presentaron lesión fueron descartados del análisis estadístico.

5.7 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de *t* de student no pareada para analizar los datos obtenidos de la tarea de atenuación de la neofobia en las ratas operadas y lesionadas en corteza insular y en hipocampo antes y después de la conducta. Se eligió esta prueba porque permite comparar entre dos grupos una variable intercalar y es empleada cuando la $n < 30$.

Se realizó también una prueba de *t* de student pareada para analizar los datos obtenidos de las pruebas de memoria, se eligió esta prueba porque permite comparar el antes y el después de un mismo tratamiento para un mismo grupo.

Para el análisis de los datos obtenidos del Laberinto acuático de Morris se empleó la prueba estadística de ANOVA de medidas repetidas, porque se quería comparar entre los ensayos realizados por cada grupo, esta prueba es similar a la *t* de student, pero la *t* es sólo para dos medidas y el ANOVA se emplea para más de dos medidas de un mismo grupo.

6 Resultados

6.1 Histología

Al finalizar los experimentos se realizó la histología correspondiente para corroborar que la inyección intracerebral bilateral de NMDA se realizó en el hipocampo y en la corteza insular. Las ratas fueron inyectadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg), posteriormente fueron perfundidas por vía aórtica con solución salina (0.9%). Los cerebros que fueron tratados con NMDA y no presentaron lesión fueron descartados del análisis estadístico.

En las figuras 11, 12, 13 y 14, se muestran fotografías representativas de cortes realizados en el hipocampo o corteza insular. Uno de los cortes representa la lesión producida por NMDA y el otro al grupo inyectado con solución vehículo.

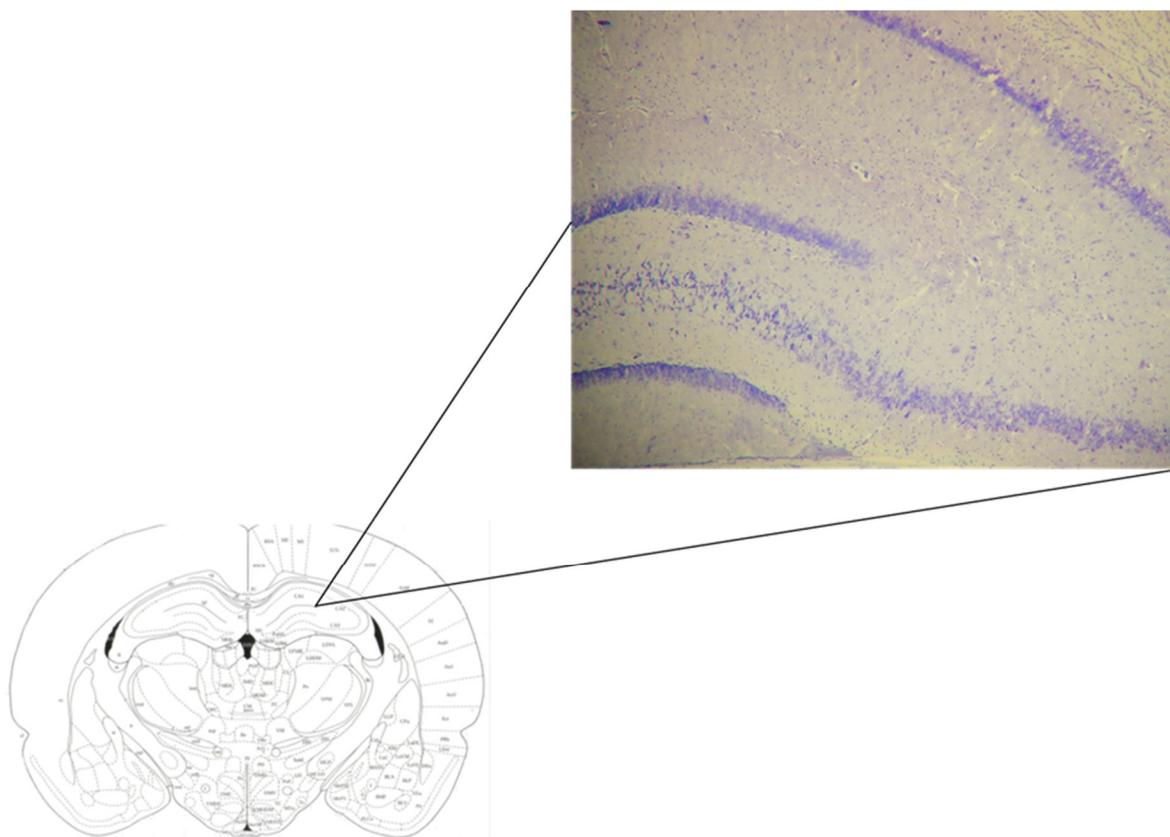


Fig. 11 Corte coronal del cerebro de rata. La fotografía de la derecha muestra el hipocampo de una rata inyectada con solución vehículo. A la izquierda se muestra un esquema de la región. Aumento 10x, tinción NISSL (Paxinos y Watson, 1998).

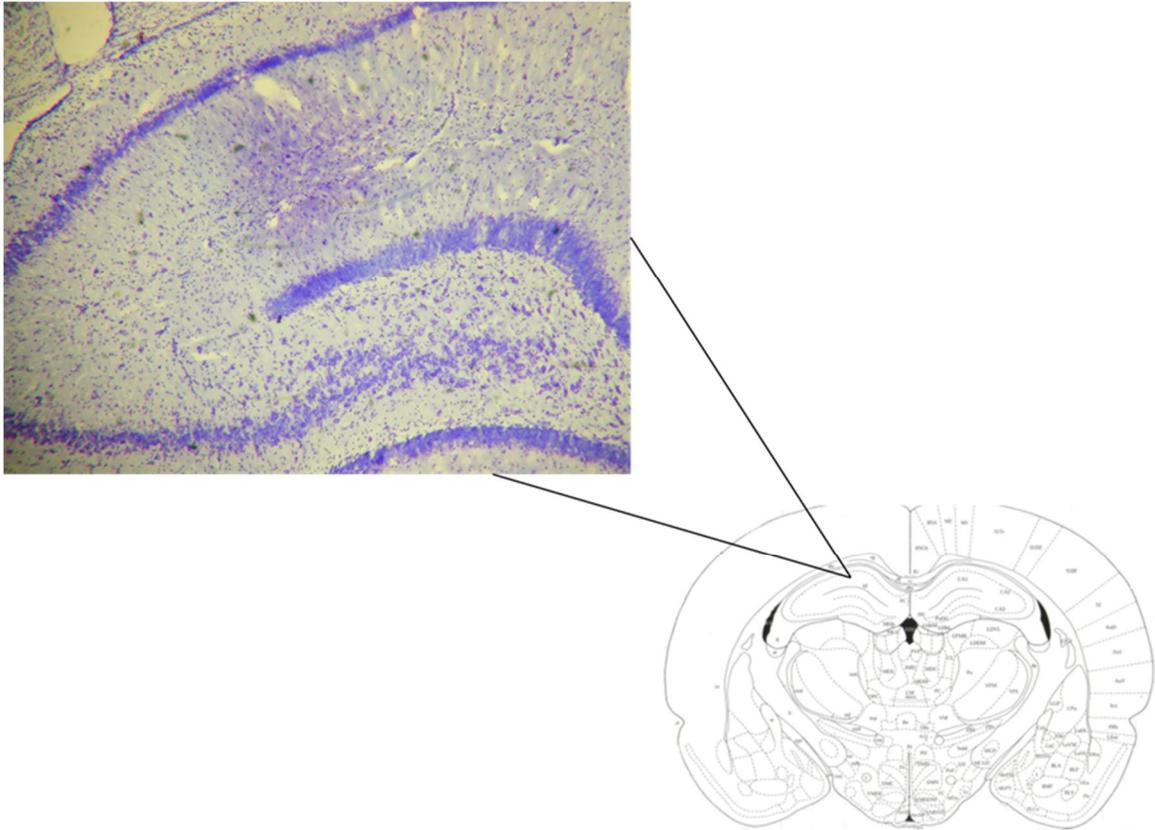


Fig. 12 Corte coronal del cerebro de rata. La fotografía de la izquierda muestra el hipocampo de una rata con lesión producida por la inyección de NMDA. A la derecha se muestra un esquema de la región. Aumento 10x, tinción NISSL (Paxinos y Watson, 1998).

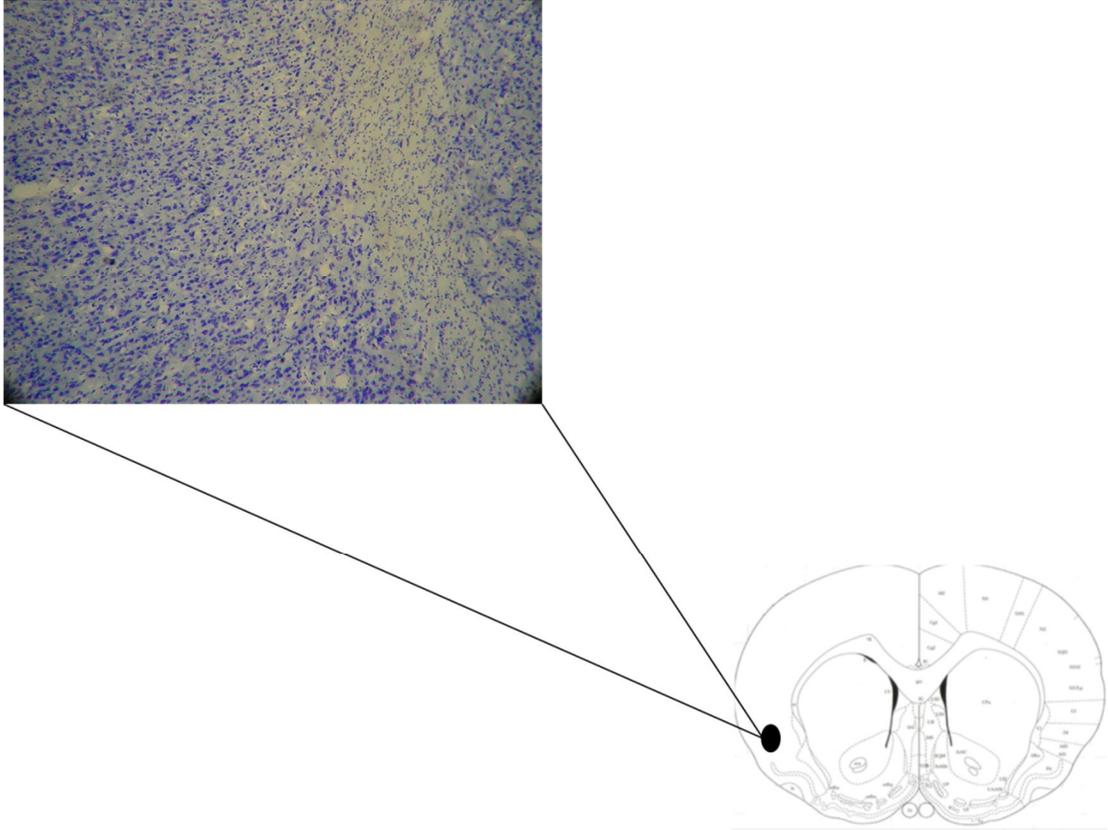


Fig. 13 Corte coronal del cerebro de rata. La fotografía de la izquierda muestra la corteza insular de una rata inyectada con solución vehículo. En la derecha se muestra un esquema de la región. Aumento 10x, tinción NISSL (Paxinos y Watson, 1998).

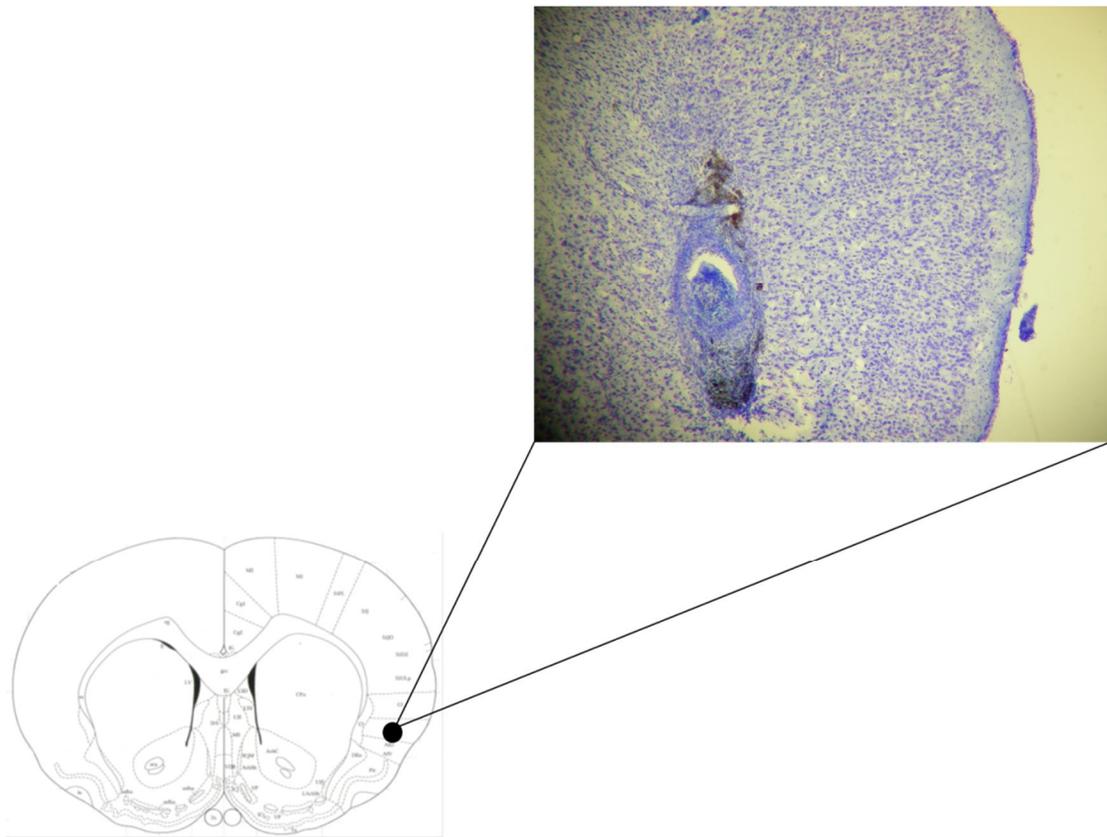


Fig. 14 Corte coronal del cerebro de rata. La fotografía de la derecha muestra la corteza insular de una rata con lesión provocada por una inyección de NMDA. En la izquierda se muestra un esquema de la región. Aumento 10x, tinción NISSL (Paxinos y Watson, 1998).

Después de realizar las histologías correspondientes se descartó del análisis estadístico a los animales que fueron inyectados con NMDA en el hipocampo y no presentaron lesión en esta estructura, los grupos quedaron de la siguiente forma NMDA n= 6 y VEH n=4

De igual manera, después de realizar las histologías correspondientes para los animales inyectados en la corteza insular, se descartó del análisis estadístico a los animales que fueron inyectados con NMDA y no presentaron lesión en corteza insular, los grupos quedaron de la siguiente forma NMDA n= 7 y VEH n= 6.

Al terminar las dos pruebas de la tarea de atenuación de la neofobia en corteza insular se tenía una n= 13 incluyendo ambos grupos el de VEH n= 6 y el de NMDA n= 7. Posterior a esta tarea se realizó una nueva tarea (CAS) con las mismas ratas, sin embargo se descartaron dos ratas más del grupo de VEH debido a que no adquirieron la tarea del CAS a pesar de que no tenían lesión resultando una n= 4 y el grupo NMDA mantuvo la misma n=7.

Antes de la histología los grupos de animales a los que se les realizó la infusión de solución vehículo o NMDA en hipocampo previo a la conducta de atenuación de la neofobia se conformaban de la siguiente manera: NMDA n= 10 VEH n= 9.

Después de la histología del grupo de animales que fueron inyectados en el hipocampo antes de la conducta de atenuación de la neofobia se descartó del análisis estadístico a los animales que recibieron infusiones de NMDA en hipocampo y no presentaron lesión quedando los grupos de la siguiente forma: NMDA n= 9 y VEH n = 6.

6.2 Participación del Hipocampo en la permanencia de la memoria de reconocimiento de sabores.

Con el fin de que los animales alcanzaran una asíntota de aprendizaje se realizaron nueve ensayos de atenuación de la neofobia, los cuales consistieron en la presentación de sacarina una vez por día durante 15 minutos. En la figura 15 se muestra la adquisición de la tarea de atenuación de la neofobia, la línea base de consumo (PROM LB) que es el promedio de consumo de agua y las nueve atenuaciones de la neofobia (AN1-AN9). Podemos observar que tanto los animales del grupo vehículo como los del grupo de NMDA adquieren la tarea sin problemas. No existen diferencias significativas en los consumos entre los grupos NMDA y VEH, antes de realizar la inyección del fármaco.

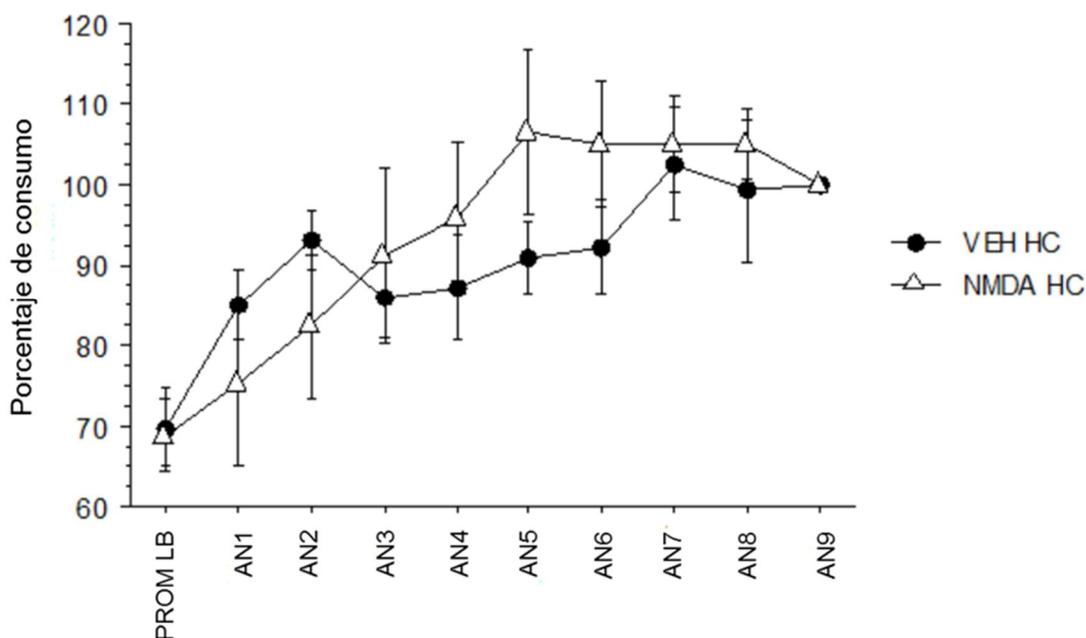


Fig. 15 Gráfica de atenuación de la neofobia. Consumos de los grupos VEH HC y NMDA HC en hipocampo, PROM LB y AN1-AN9. Datos expresados como consumo en mL.

Para asegurar que ambos grupos experimentales habían tenido una adquisición similar evaluamos el promedio de consumo de los 9 días de atenuación de la neofobia (Fig. 16). No se observan diferencias significativas en los consumos entre los grupos NMDA HC y VEH HC y se corroboró con una prueba estadística *t student* no pareada ($t_{10} = 1.003$; $p = 0.3259$).

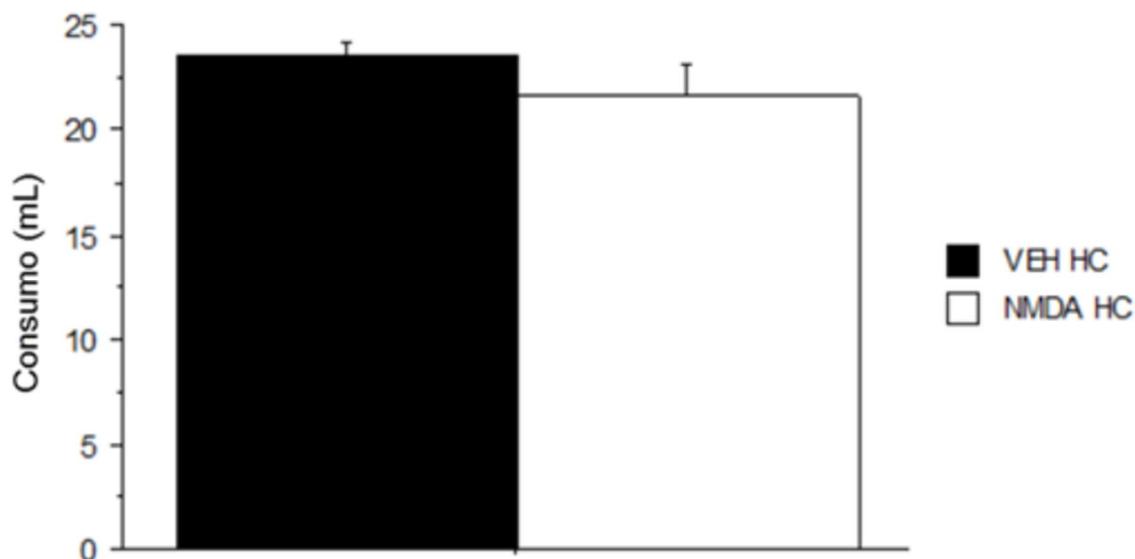


Fig. 16 Gráfica de promedios atenuación de la neofobia. Consumos de los grupos VEH HC y NMDA HC. No existen diferencias significativas entre los grupos NMDA HC y VEH HC. Datos expresados como consumo en mL.

Una semana después de la última atenuación de la neofobia, se sometió a los animales a una inyección intracerebral bilateral en el hipocampo de NMDA o solución vehículo (dependiendo del grupo al que pertenecieran). Se dejó transcurrir una semana después de la inyección para permitir que los animales se recuperaran de la cirugía; se volvió a dar un día de línea base a los animales, en el cual se les presentó una pipeta con agua por 15 min. Durante los dos días siguientes se les presentó sacarina durante 15 min como prueba de memoria.

Como se puede observar en la figura 17, ambos grupos de animales disminuyen el consumo comparado con el último día de atenuación de la neofobia, tomando este consumo como el 100%; se realizó una prueba estadística de *t student* pareada para comparar los datos obtenidos entre la AN9 y PBA 1, encontramos diferencias significativas en los consumos de ambos grupos NMDA ($t_6 = 3.956$; $p = 0.0075$) y VEH ($t_6 = 4.235$; $p = 0.0133$). Sin embargo, ambos grupos incrementan el consumo al día siguiente, en la PBA 2, lo que sugiere que la memoria de reconocimiento de sabores permanece intacta.

Además, podemos observar que ambos grupos, VEH y NMDA, tienen un consumo semejante en ambas pruebas. No existe diferencia significativa entre los grupos según los datos

obtenidos con la prueba de t no pareada ($t_{10} = -0.20$; $p = 0.9841$) ($t_{10} = -1.180$; $p = 0.2652$), por lo tanto sabemos que no se afectó la memoria previamente adquirida.

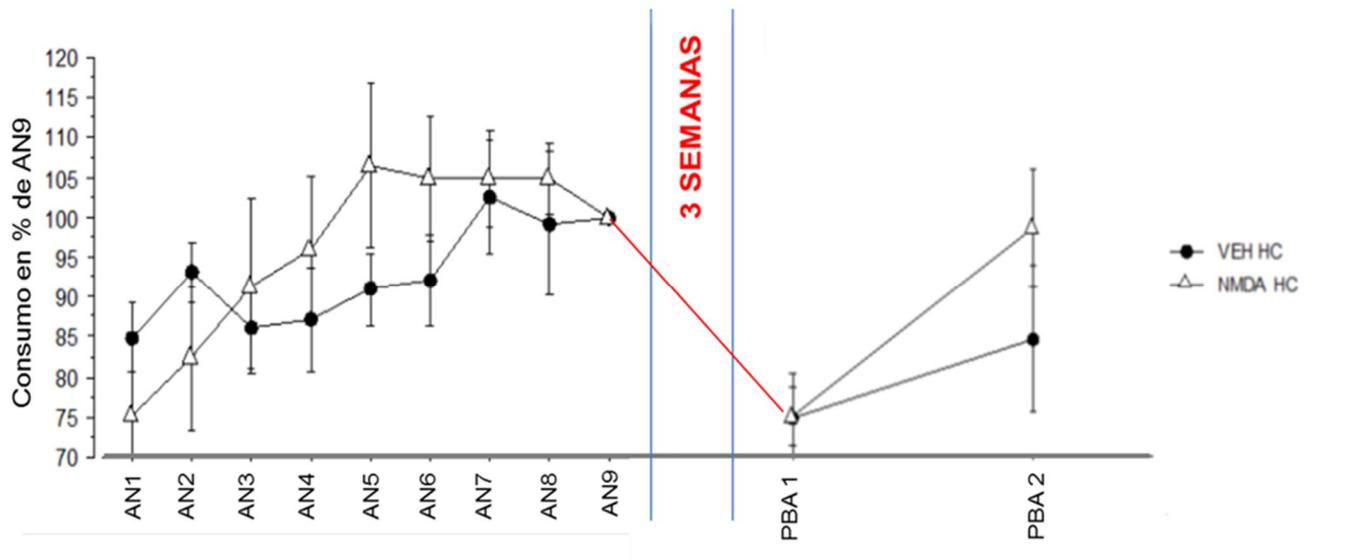


Fig. 17 Gráfica de atenuación de la neofobia. Consumos de los grupos VEH HC y NMDA HC, el último día de la presentación de la sacarina (AN9) y en las dos pruebas de memoria (PBA1 y PBA 2) realizadas dos semanas después del último ensayo de adquisición. Datos expresados como porcentaje del consumo el día de la neofobia.

6.3 Participación de la Corteza Insular en la permanencia de la memoria de reconocimiento de sabores

Además del hipocampo, deseamos evaluar la participación de la corteza insular (CI) en la permanencia de la memoria de sabores, para ello, se realizaron las mismas nueve adquisiciones de la atenuación de la neofobia lo que se muestra en la figura 18. Podemos observar que tanto los animales del grupo vehículo como los del grupo de NMDA adquieren la tarea sin problemas. No existen diferencias significativas en los consumos entre los grupos NMDA y VEH, antes de realizar la inyección del fármaco.

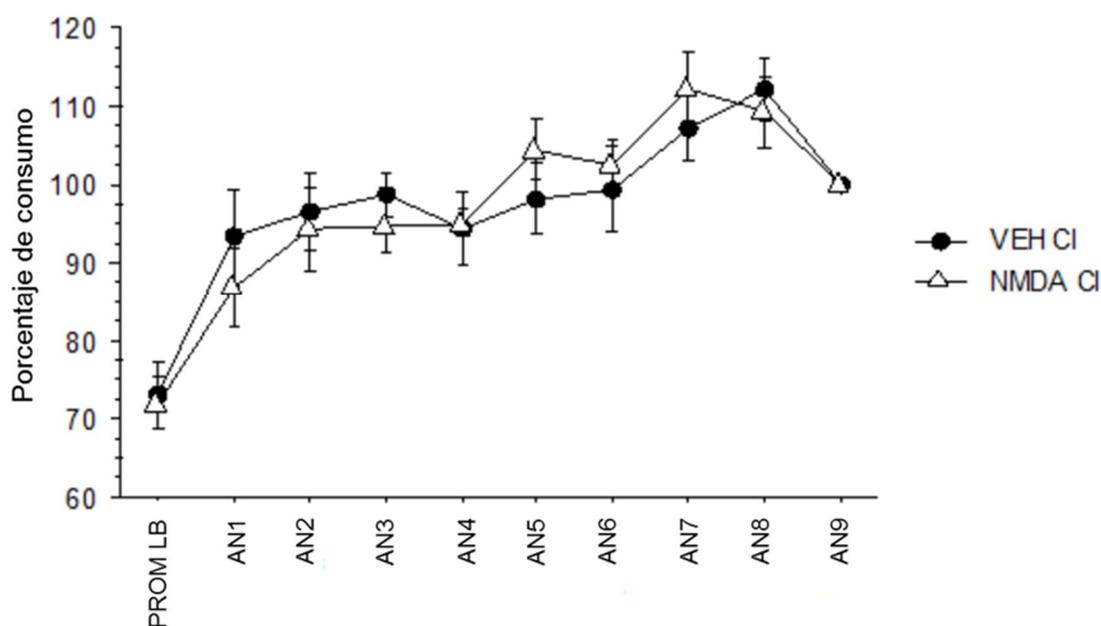


Fig. 18 Gráfica de atenuación de la neofobia. Consumos de los grupos VEH CI y NMDA CI en corteza insular, PROM LB y AN1-AN9. Datos expresados como consumo en mL.

Al comparar los promedios de los consumos durante los nueve días de atenuación de la neofobia entre ambos grupos, se puede observar que no hay diferencia entre los grupos VEH y NMDA según los datos obtenidos de la prueba estadística *t student* no pareada ($t_{13} = -2.026$; $p = 0.0638$) (Fig. 19).

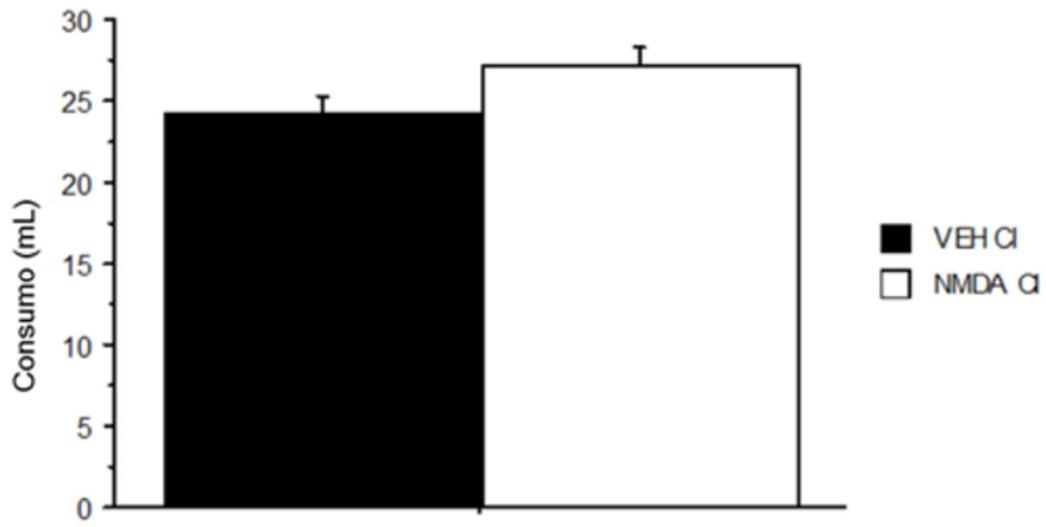


Fig. 19 Gráfica de promedios atenuación de la neofobia. Consumos de los grupos VEH CI y NMDA CI. No existen diferencias significativas entre los grupos NMDA CI y VEH CI . Datos expresados como consumo en mL.

Al igual que se hizo con los animales inyectados en el hipocampo, una semana después de la última adquisición de la tarea de atenuación de la neofobia, se sometió a los animales a la infusión intracerebral bilateral en CI con NMDA o solución vehículo. Se dejó transcurrir una semana más para permitir que los animales se recuperaran de la cirugía. Se les dio un primer consumo de agua durante 15 min y al día siguiente se realizó la prueba de memoria la cual consistió en la presentación de sacarina dos días consecutivos. En la figura 20 se observa las nueve atenuaciones, y las dos pruebas (PBA 1 y 2), se puede ver que no hay diferencia entre los grupos NMDA y vehículo el día de la PBA SAC 1 ($t_{13} = -3.26$; $p = 0.7496$), pero que sí existe una diferencia entre los grupos NMDA y vehículo en la PBA SAC 2 ($t_{13} = 2.744$; $p = 0.0167$). Además, pudimos observar, que como en el caso de los animales inyectados en el hipocampo, ambos grupos disminuyen el consumo comparado con el día de la última atenuación de la neofobia, tomando este consumo como el 100%; NMDA: ($t_7 = 5.330$; $p = 0.0011$) VEH: ($t_6 = 4.473$ $p = 0.0042$). Además existe diferencia entre el día de la PBA 1 y PBA 2 en el grupo VEH: ($t_6 = -3.012$; $p = 0.0236$) pero ésta diferencia no existe para el grupo NMDA: ($t_7 = -0.810$; $p = 0.4448$). Estos datos indican que existe un efecto sobre la memoria ya consolidada debido a la lesión provocada por la infusión de NMDA en la CI, se puede observar que los animales no recuerdan la tarea de atenuación, ya que en la PBA 2 las ratas inyectadas con NMDA en CI no aumentan su consumo a diferencia de las ratas inyectadas con solución vehículo.

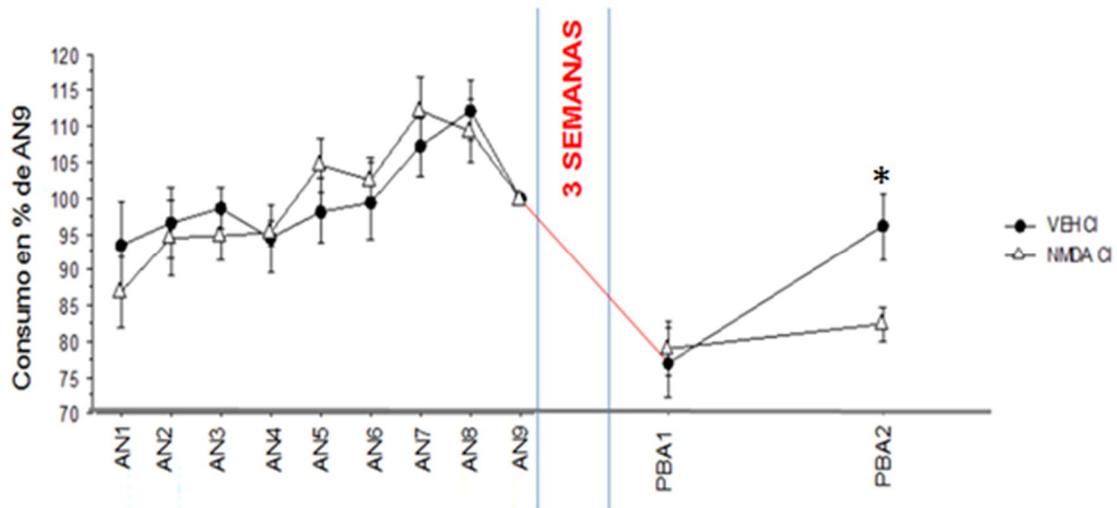


Fig. 20 Gráfica de atenuación de la neofobia. Consumos de los grupos VEH CI y NMDA CI, el último día de presentación de la sacarina (AN 9) y en las dos pruebas de memoria (PBA 1 y PBA 2) realizadas dos semanas después del último ensayo de adquisición. Diferencia significativa entre grupos en PBA SAC2. Datos expresados como porcentaje del consumo el día de la neofobia, * $p = 0.0167$.

6.3.1 Condicionamiento de Aversión al Sabor y Corteza Insular

Con el propósito de asegurar que la corteza insular fue lesionada después de la inyección intracerebral bilateral de NMDA. Se realizó una tarea de memoria de condicionamiento aversivo al sabor (CAS), la cual consistió en la presentación nuevamente de línea base durante dos días, al tercer día se les dio de beber NaCl 0.1M y 15 min después de haberles presentado el sabor se les inyectó cloruro de litio (LiCl) 0.4M, en una cantidad ajustada al peso de cada rata; se realizó esta tarea porque se sabe que la corteza insular participa en la adquisición y consolidación de esta tarea de memoria.

En nuestros resultados podemos observar que sí existen diferencias entre los grupos VEH y NMDA en el consumo de sacarina el día de la prueba (PBA CAS) (Fig. 21), lo cual se corroboró con una prueba estadística de t no pareada ($t_{11} = -2.319$; $p = 0.0406$). Estos datos corroboran que los animales inyectados con NMDA en la CI sí tienen lesión en esta estructura lo que impide que adquieran el CAS.

Además se realizó una prueba de t pareada para ver si existían diferencias entre el consumo el día del CAS y el día de la prueba (PBA CAS) en cada grupo con lo que encontramos que sí existen diferencias entre el consumo el día del CAS y el día de la PBA para el grupo vehículo VEH ($t_4 = 3.332$; $p = 0.0290$), pero no así para el grupo NMDA ($t_7 = -1.506$; $p = 0.1758$), es decir, los

animales inyectados con solución vehículo disminuyen su consumo el día de la prueba indicando que adquirieron adecuadamente el CAS.

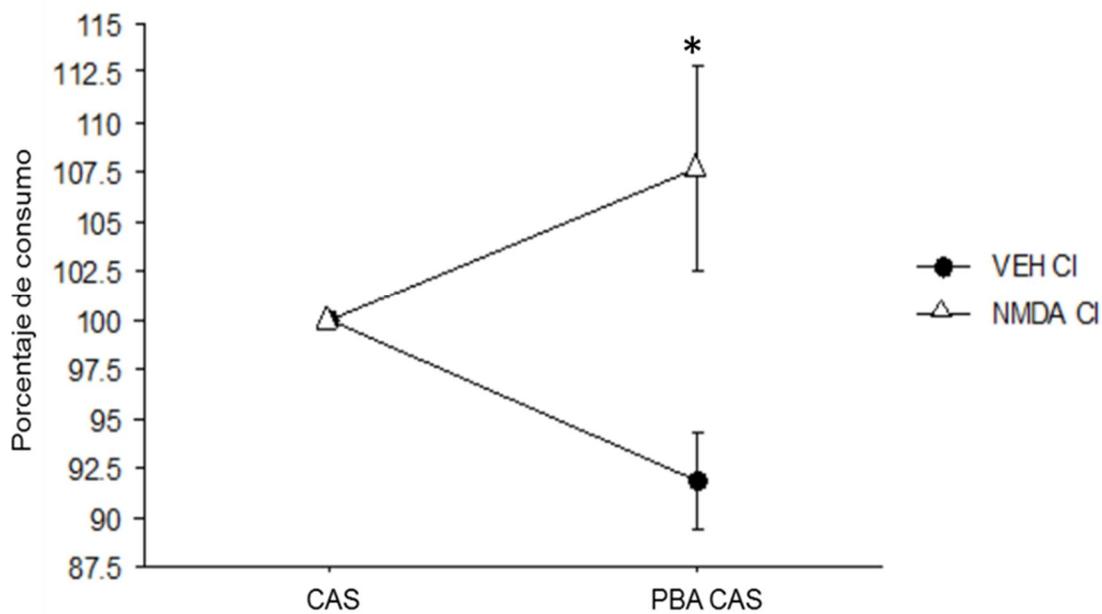


Fig. 21 Gráfica de consumo de sacarina el día de Condicionamiento aversivo al sabor (CAS) y el día de la prueba (PBA) en corteza insular. Datos expresados como porcentaje de consumo, * $p = 0.0406$.

6.4 Participación del Hipocampo en la adquisición de reconocimiento de sabores

Para determinar si una lesión excitotóxica como la que provoca la inyección intracerebral de NMDA afecta el papel del hipocampo en la adquisición de la tarea de atenuación de la neofobia se realizó una inyección bilateral de NMDA o solución vehículo en el hipocampo. La cirugía se llevó a cabo una semana antes de que se realizara la tarea conductual de atenuación de la neofobia. Después de la cirugía los animales tuvieron una semana de recuperación; concluida ésta se les realizó la tarea conductual; con la finalidad de que los animales mostraran una curva de aprendizaje, se realizaron cuatro ensayos de atenuación de la neofobia los cuales consistieron en la presentación de sacarina una vez por día, durante 15 minutos. En la figura 22 podemos observar que tanto el grupo sin lesión como el que tiene inactivado el hipocampo tienen una atenuación de la neofobia normal, alcanzan una asíntota de consumo, en la que se considera que el sabor novedoso es reconocido como familiar. No existen diferencias significativas en los consumos entre los grupos NMDA y VEH en hipocampo (HC) ($t_{15} = -0.556$; $p = 0.5867$) ($t_{15} = -0.401$; $p = 0.6940$) ($t_{15} = -0.848$; $p = 0.4097$) ($t_{15} = -0.818$; $p = 0.4263$).

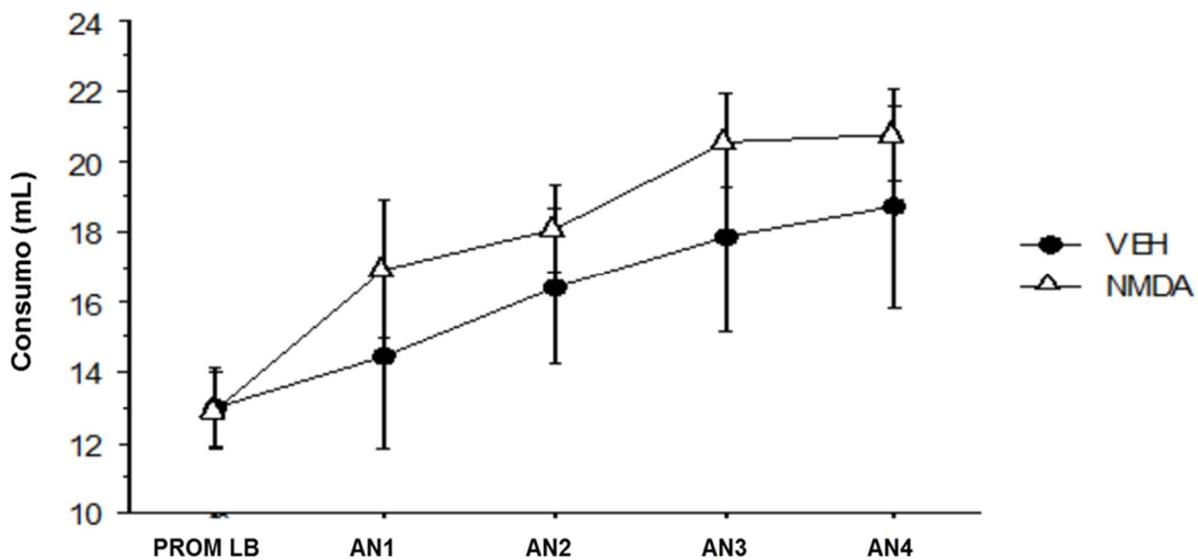


Fig. 22 Gráfica de atenuación de la neofobia. Consumos de los grupos VEH y NMDA en hipocampo, PROM LB y AN1-AN4. Datos expresados como consumo en mL.

Estos resultados sugieren que el hipocampo no participa en la adquisición de la atenuación de la neofobia, ya que a pesar de tener el hipocampo lesionado por las inyecciones de NMDA adquieren la tarea conductual sin problema.

6.4.1 Participación del Hipocampo en Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris es una tarea espacial dependiente de hipocampo. Por ello se entrenó a las ratas ya lesionadas con NMDA en el HC y a las inyectadas con vehículo (VEH) en esta tarea, para comprobar que realmente se lesionó de manera adecuada el hipocampo. Como se puede ver en la figura 23, los animales lesionados no adquieren la tarea, no disminuyen la latencia (tiempo en el que el animal llega a la plataforma) conforme avanzan los entrenamientos. En cambio los animales inyectados con solución vehículo disminuyen el tiempo a lo largo de los seis entrenamientos. Esto se corroboró aplicando una prueba estadística de ANOVA de repetidas medidas para cada grupo, la cual nos muestra que efectivamente existen diferencias en las latencias entre cada día de entrenamiento por grupo. NMDA: ($F_5 = 2.609$; $p = 0.0392$) VEH : ($F_5 = 5.674$; $p = 0.0005$)

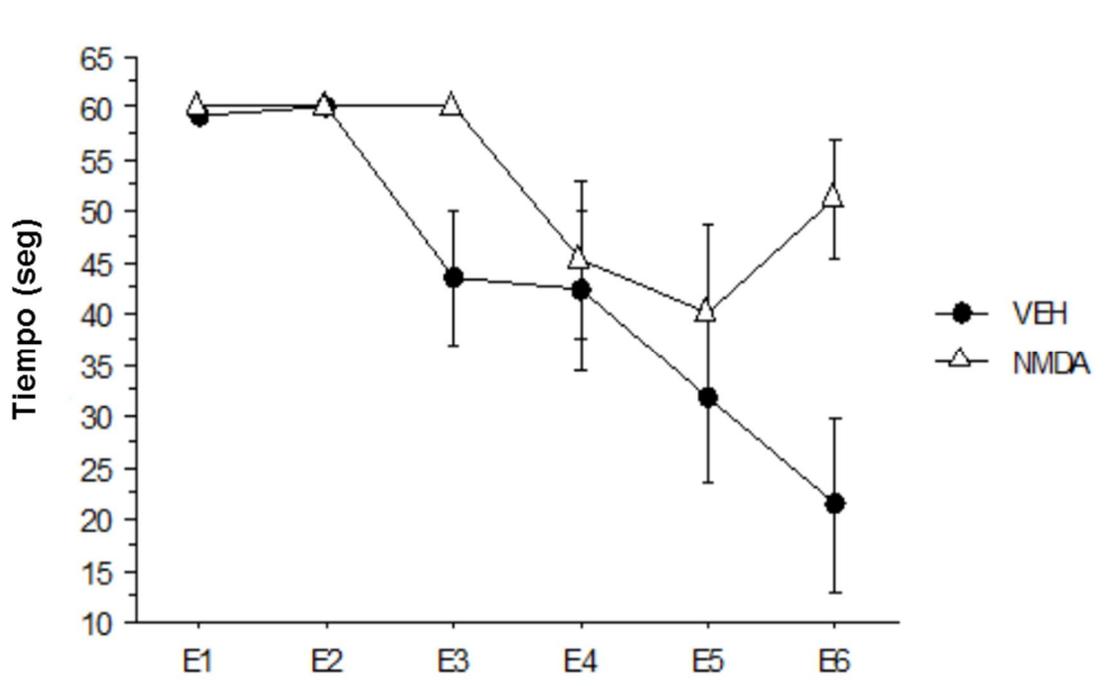


Fig. 23 Gráfica de laberinto acuático de Morris. E1-E6 diferencias significativas entre grupos. Datos expresados como tiempo en seg.

Se realizó una prueba de memoria 24 horas después del último ensayo (Fig. 24). En esta prueba podemos observar que existen diferencias entre grupos ($t_{15} = -2.830$; $p = 0.0127$) los animales inyectados con NMDA tardan o no encuentran la plataforma dentro del tanque, indicando que no adquirieron la tarea adecuadamente. Estos datos corroboran que la inyección de NMDA en el hipocampo daña a la estructura impidiendo que adquieran una tarea dependiente de la misma.

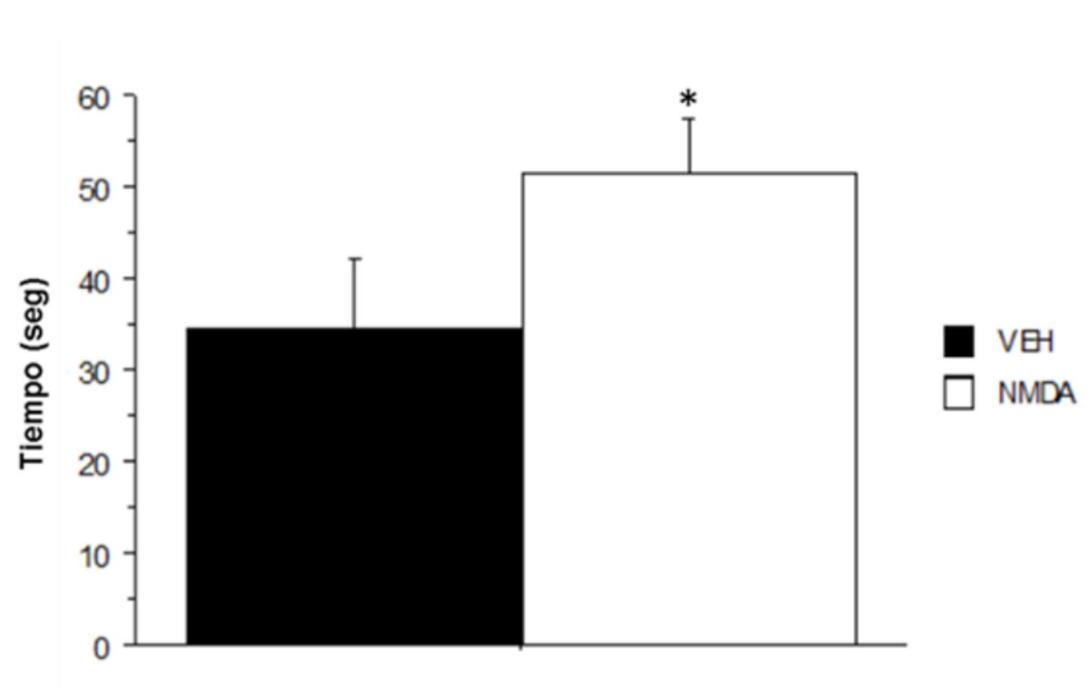


Fig. 24 Gráfica de la prueba del Laberinto acuático de Morris. PBA existen diferencias significativas entre grupos. Datos expresados como tiempo en seg, * $p = 0.0127$.

7 Discusión

Para la permanencia de la memoria a largo plazo, ésta debe pasar por un proceso conocido como consolidación celular o sináptica. Este proceso se refiere a la cascada de modificaciones postraduccionales de las proteínas sinápticas, la activación de factores de transcripción, la modulación de la expresión génica en la sinapsis y el cuerpo celular, así como la reorganización de las proteínas sinápticas, que termina con la remodelación sináptica, todo esto con el fin de hacer un trazo estable de la memoria (Dudai, 2004).

Además, se ha establecido que los recuerdos pasan a un segundo nivel de consolidación o consolidación de sistemas, proceso que involucra una reorganización gradual de algunas estructuras del cerebro después de la consolidación sináptica (Squire y Kandel, 2009). Esta teoría propone que existe una transferencia de los nuevos conocimientos adquiridos a través del tiempo del hipocampo hacia áreas corticales, considerándose como una consolidación en un segundo nivel de la memoria.

Los sistemas de consolidación han sido evaluados en humanos y animales mediante lesiones o inactivaciones temporales del hipocampo (Anagnostaras *et al.*, 1999; Knowlton y Fanselow, 1998; Maren *et al.*, 1997). En este trabajo, se describe la participación del hipocampo y de la corteza insular en la permanencia a largo plazo de la memoria de sabores, es decir en la consolidación de sistemas. Además, se describe la participación de estas estructuras durante la adquisición y consolidación de la atenuación de la neofobia.

Se sabe que el hipocampo participa en el procesamiento y almacenamiento de memorias gustativas (Bures, 1998). Sin embargo, su participación en la permanencia de este tipo de memoria no había sido estudiada hasta ahora. Aquí se evaluó su participación en la permanencia de la memoria de atenuación de la neofobia como parte de la memoria de reconocimiento de sabores. La inactivación citotóxica del hipocampo (mediante inyecciones de NMDA) posterior a la adquisición y consolidación de la memoria de atenuación no tiene efecto sobre la retención de la misma. Es decir, el hipocampo bajo estas condiciones, no participa en el mantenimiento de la memoria segura de sabores.

Relacionado con estos resultados, existe un trabajo realizado por Kim y Fanselow en 1992 en el que se empleó la tarea de condicionamiento al miedo y se inactivó el hipocampo justo después de la adquisición de la tarea, estos animales conservaron el trazo previamente adquirido. Por ello se propuso que esta estructura juega un papel limitado en el condicionamiento contextual al miedo, ya que sólo participa en la adquisición de la tarea.

Nadel y Moscovitch, propusieron en 1997 que podía existir un trazo múltiple en la memoria. Esta teoría plantea que el complejo hipocampal codifica rápidamente toda la información que es obtenida y enlaza a las neuronas neocorticales y a otras que representan esa experiencia en un trazo de memoria. Esta información es distribuida en una red de neuronas del complejo hipocampal que actúa como un punto o índice para las neuronas, representando la información que fue adquirida. El trazo de memoria de un episodio, consiste además de un obligado ensamble de las neuronas de la neocorteza y el hipocampo/lobulo medial temporal, las cuales representan la memoria de un evento experimentado conscientemente. La formación y consolidación de estos trazos es relativamente rápida durando segundos, máximo días. En este modelo no existe un proceso de consolidación prolongado, como los modelos estándar afirman. En su lugar, cada vez que una memoria vieja es recuperada, un nuevo trazo mediado por el hipocampo es creado. De modo que las viejas memorias son representadas por una mayor cantidad y más fuerte de trazos hipocampo-lobulo medial temporal-neocorteza que cuando son nuevos y por lo tanto son menos susceptibles a la interrupción por daño cerebral que las memorias recientes (Moscovitch *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que una memoria semántica puede existir independientemente de la contribución del hipocampo o el lóbulo medial temporal, propusieron además que sólo información episódica espacial detallada, directamente relacionada con la re-experimentación de un evento, está mediada por el hipocampo, información necesaria para la navegación, que ha sido denominada esquemáticamente como semántica. La memoria espacial, está mediada inicialmente por el hipocampo, pero al igual que otras formas de memoria semántica, puede existir independientemente del hipocampo una vez que esta memoria haya sido asimilada (Moscovitch *et al.*, 2005).

Al respecto, se ha propuesto una teoría que sugiere que cuando nueva información es originalmente codificada y registrada, la memoria de este nuevo estímulo, es retenida en el hipocampo y en la región cortical; las memorias consideradas como nuevas, que son originalmente dependientes del hipocampo, se transforman en memorias remotas almacenadas en redes corticales volviéndose independientes del hipocampo (Frankland y Bontempi, 2005).

Los datos que se obtuvieron en este trabajo apuntan a que el hipocampo no tiene participación en la permanencia de la memoria. Sin embargo en 2008, De la Cruz y colaboradores demostraron que el hipocampo está involucrado en el almacenamiento de la memoria de sabores seguros a largo plazo ya que inyecciones de anisomicina en esta estructura afectan la consolidación de la atenuación de la neofobia (Fig. 25). Estos efectos sugieren que la síntesis de proteínas en el hipocampo es necesaria para establecer la memoria a largo plazo de sabores seguros y por lo tanto, que esta estructura desempeña un papel en la etapa de consolidación

sináptica de la memoria pero, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, no participa en su evocación o permanencia a largo plazo.

Sin embargo, se encontró que al inactivar el hipocampo con infusiones de NMDA antes de la atenuación de la neofobia, no ocurrió un efecto sobre la adquisición o la consolidación de dicha tarea. Por lo tanto se propone que otras estructuras involucradas en la adquisición de la atenuación de la neofobia pudieron actuar de manera compensatoria en sustitución de la estructura lesionada. Esto tomando en cuenta que la lesión se realizó una semana antes de que se realizara el protocolo conductual, dando tiempo al sistema de tratar de compensar.

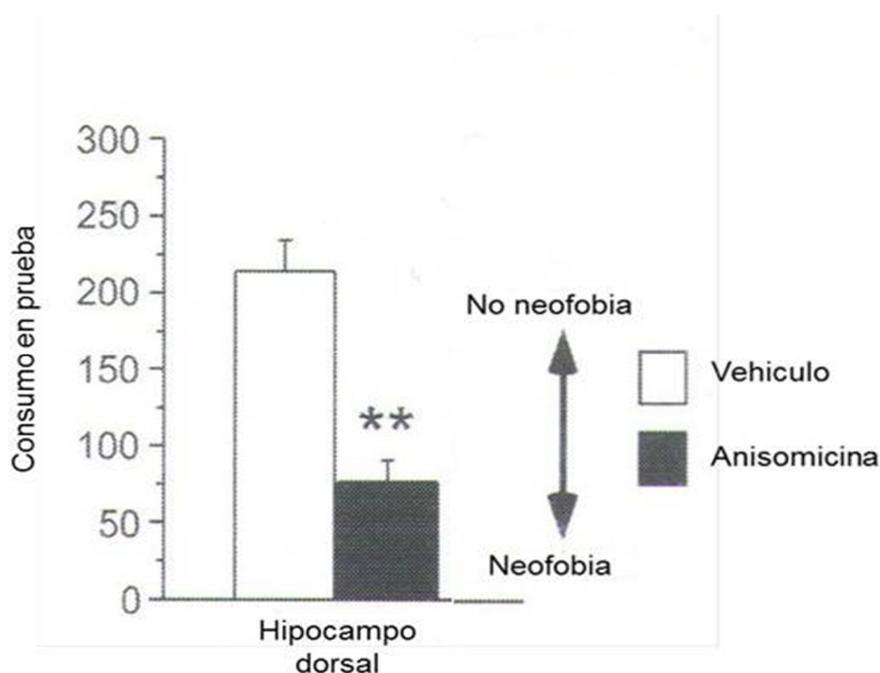


Fig. 25 Gráfica de memoria de sabores segura. Efectos de la inhibición de síntesis de proteínas en el hipocampo en la memoria a largo plazo para la atenuación de la neofobia. La anisomicina bloquea la formación de la memoria a largo plazo cuando se administra anisomicina. ** $P < 0.01$. Modificado de De la Cruz *et al.*, 2008.

Acorde a nuestros resultados está la teoría de trazo múltiple, en la que se sugiere que si cada trazo de memoria es único, la creación de múltiples trazos relacionados facilita la extracción de la información común entre ellos mediada por la neocorteza. Esta información es entonces integrada con conocimiento pre-existente para formar memorias semánticas que pueden existir independientemente del hipocampo o del lóbulo temporal medial.

Por otro lado existe evidencia que relaciona a la CI con el procesamiento y almacenamiento de la memoria gustativa, también se le conoce como corteza visceral, ya que recibe información de tipo gustativa y conexiones del tálamo, aunque sus principales conexiones provengan del sistema límbico, y son aferencias de la amígdala (Bures, 1998). Se ha visto que la corteza insular es importante para la adquisición de la memoria gustativa de aversión (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Escobar y Bermúdez Rattoni, 2000), además de que si se inactiva temporalmente esta estructura por medio de un bloqueador de canales de sodio sensibles a voltaje, la tetrodoxina (TTX), antes de la adquisición de la tarea, se impide la formación del CAS (Gallo *et al.*, 1992).

Dado entonces la participación de la CI en el reconocimiento de sabores, se evaluó su participación en la permanencia de la memoria de reconocimiento del sabor, mediante la inactivación de la misma posterior a la adquisición y consolidación de la tarea de atenuación de la neofobia, como se hizo con el hipocampo. Pensando que esta estructura cortical podría ser parte de la red cortical que podría mantener el trazo independiente del hipocampo.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el trazo de memoria previamente adquirido y consolidado se ve afectado por la inactivación de la CI sugiriendo, que la memoria de sabores seguros permanece en esta estructura a lo largo del tiempo. Esta estructura se ha relacionado con el procesamiento de información gustativa así como en la consolidación de tareas de memoria como el CAS y la atenuación de la neofobia (Bermúdez-Rattoni, 2004).

En relación a nuestros resultados existe un trabajo que señala que la actividad metabólica en el hipocampo es más alta cuando la consolidación está teniendo lugar, mientras que la actividad cortical también ha sido detectada aunque con menor intensidad. Estos patrones de actividad se invierten cuando la memoria reciente llega a ser memoria remota, sugiriendo con esto un rol de todas las estructuras en todo momento, pero con diferente relación de tiempo-fuerza (Bontempi *et al.*, 1999).

Nuestros resultados coinciden además con la “teoría C” propuesta por Dash, que se refiere a la consolidación de sistemas en la cual postula que la memoria es almacenada simultáneamente en áreas hipocampales y neocorticales y quizás en otras estructuras no hipocampales, como resultado del aprendizaje. El hipocampo juega el papel de coordinador inicial para la recuperación de la memoria hasta que conexiones extrahipocampales hayan desarrollado la capacidad para hacerse cargo de este papel (Dash *et al.*, 2004).

En el presente trabajo comprobamos que la memoria de sabores seguros no permanece en el hipocampo, aparentemente pasa a estructuras corticales después de un tiempo determinado, tal como se plantea en la teoría de consolidación de sistemas, que establece que cuándo nueva información es originalmente codificada y registrada, la memoria de este nuevo estímulo, llega a

ser retenida en el hipocampo y en la región cortical; las memorias que son originalmente dependientes del hipocampo se transforman en memorias remotas en redes corticales y se vuelven independientes de hipocampo (Frankland y Bontempi, 2005).

Además, existen trabajos en los que se reporta que algunos déficits en la memoria remota están limitados a la recuperación de eventos dentro de los últimos años, sugiriendo que los recuerdos más antiguos, son almacenados y pueden ser recuperados fácilmente sin la participación del lóbulo temporal medial (Milner, 1966; Corkin, 1984 En: Moscovitch *et al.*, 2005). Con esto se demostró que el lóbulo temporal medial y estructuras diencefálicas relacionadas no están involucradas en el procesamiento de la memoria a corto plazo o en el almacenamiento de memorias remotas. En lugar de eso, su función es ayudar a la consolidación de la memoria en otras regiones cerebrales y codificar, almacenar y recuperar recuerdos hasta que la consolidación es completada (Moscovitch *et al.*, 2005). Este trabajo propone una participación del hipocampo limitada, lo que también concuerda con los resultados que obtuvimos.

Se propone en este trabajo que la corteza perirrinal podría ser una de las estructuras que participan compensando al hipocampo inactivado para la adquisición de la tarea de neofobia, ya que esta estructura es parte de la región parahipocampal (Moscovitch *et al.*, 2005). Específicamente el hipocampo y la corteza perirrinal están conectadas directa e indirectamente vía la corteza entorrinal (Witter *et al.*, 1989, 2000; Burwell *et al.*, 1995 En: Jo YS. y Lee I., 2010). Las conexiones recíprocas entre estas dos áreas sugieren que la corteza perirrinal participa en el procesamiento de la información en el hipocampo y viceversa (Jo YS. y Lee I., 2010).

Jo y Lee en 2010, realizaron un trabajo con el fin de saber cuál era la interacción funcional entre el hipocampo y la corteza perirrinal en la tarea de asociación objeto-lugar pareado. Ellos realizaron inyecciones bilaterales de muscimol (agonista selectivo de los receptores GABA) dentro del hipocampo y de la corteza perirrinal; el efecto que presentaron los animales por la inyección de muscimol fue la incapacidad de realizar la tarea de manera normal en ausencia del hipocampo o de la corteza perirrinal. Además inyecciones de escopolamina en la corteza perirrinal impiden la atenuación de la neofobia incluso cuando este fármaco ha sido administrado después de la primera presentación del sabor (Gutiérrez *et al.*, 2004).

Por otra parte, corroboramos que la corteza insular es necesaria para la adquisición y la consolidación de la tarea de atenuación de la neofobia y para el condicionamiento aversivo al sabor; pero además, encontramos evidencia de que la información ya procesada se encuentra almacenada en la corteza insular. La teoría de la consolidación de sistemas propone que la memoria es transferida a estructuras corticales; con la evidencia de que el trazo de memoria se afectó con la inyección de NMDA en corteza insular, sugerimos que esta información está siendo almacenada y permanece a largo plazo en la corteza insular. Por lo tanto se propone que la

corteza insular está involucrada en la permanencia a largo plazo de la memoria de reconocimiento de sabores.

Basados en esta evidencia se propone que el trazo de memoria gustativa evaluada mediante la atenuación de la neofobia podría mantenerse a lo largo del tiempo, a través de la interacción de varias estructuras, entre ellas el hipocampo, la corteza insular y muy probablemente la corteza perirrinal. Si bien es cierto que la inactivación del hipocampo por sí sola no afecta el trazo previamente consolidado, ni la adquisición del trazo cuando se inactiva antes de la conducta, consideramos que puede haber una compensación entre las estructuras, entre el hipocampo y la corteza perirrinal. Sin embargo, las infusiones de NMDA en la corteza insular tienen un efecto en el trazo previo, lo que sugiere que esta estructura participa en la permanencia de la memoria de sabores seguros a largo plazo.

8 Tabla Resumen de Resultados.

Entrenamiento	Estructura	Estructura Animales al inicio	Animales inyectados con NMDA	Animales inyectados con VEH	Efecto de la inactivación
AN (inactivación después de conducta)	HC	15	6	4	
AN (inactivación después de conducta)	CI	15	7	6	✓
CAS (inactivación antes de conducta)	CI	13	7	4	✓
AN (inactivación antes de conducta)	HC	20	9	6	
LAM (inactivación antes de conducta)	HC	20	9	6	✓

9 Conclusiones

A partir de los resultados de los experimentos antes descritos, podemos concluir que no existe participación del hipocampo en la adquisición o permanencia a largo plazo de la memoria de sabores seguros, ya que no se observó ningún efecto de la inactivación del hipocampo mediante inyecciones de NMDA sobre la memoria de atenuación de la neofobia debido a que el trazo previamente consolidado se volvió independiente de hipocampo.

Como ya había sido reportado antes, el hipocampo no participa en la adquisición ni almacenamiento de la memoria de condicionamiento aversivo al sabor. Sin embargo, si es necesario para la adquisición y consolidación de la prueba Laberinto acuático de Morris. Por lo tanto corroboramos que existe participación del hipocampo en tareas espaciales.

La inactivación de la corteza insular con NMDA tiene efecto sobre la memoria de atenuación de la neofobia, por lo que proponemos que esta estructura participa en la permanencia a largo plazo de la memoria de sabores seguros y corroboramos que dicha estructura es necesaria para la adquisición y consolidación del condicionamiento aversivo al sabor.

Sugerimos que la memoria de sabores seguros no permanece a largo plazo en el hipocampo es decir se vuelve independiente de hipocampo, sin embargo sí se requiere de la corteza insular para la permanencia a largo plazo de la memoria de sabores seguros. Resultando esta estructura indispensable en cada proceso de la memoria de reconocimiento de sabores.

10 LITERATURA CITADA

- Anagnostaras SG., Maren S., Fanselow MS. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *Journal Neuroscience* 19:1106-1114.
- Anderson, J.R. (1995) Learning and Memory, an integrated approach. Jonh Wiley & Sons Ed, USA; pp 7-8.
- Anderson, J.R. (2001). Aprendizaje y memoria. Mc Graw-Hill. México.
- Baddeley, A. (1999) Memoria humana. Teoría y Práctica. Madrid España.
- Balderas I., Rodriguez-Ortiz CJ., Salgado-Tonda P., Chavez-Hurtado J., McGaugh JL., Bermudez-Rattoni F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning and Memory* 15:618-624.
- Ballesteros, S. 1999. Memoria humana: investigación y teoría. *Psicothema* 11 (4) : 705-723.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular Mechanisms of Taste Recognition Memory. *Neuroscience* 5:209-217.
- Bermúdez-Rattoni, F., McGaugh JL. (1991). Insular cortex and amygdale lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brian Research*. 549:165-70.
- Bermúdez-Rattoni F. y Prado-Alcalá. R. A. (2001) Memoria: Donde reside y cómo se forma. México: Trillas 11-36.
- Bermúdez-Rattoni, F., y Yamamoto, T. (1998). Neuroanatomy of CTA: lesions studies En: Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., y Yamamoto, T. Conditioned taste aversion. Memory of a special kind. Oxford University Press. New York.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*. 400:671-5.
- Bures, J. (1998). Ethology, physiological psychology, and neurobiology of CTA. En Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F., y Yamamoto, T. Conditioned taste aversion. Memory of a special kind. Oxford University Press. New York.
- Cui Z., Wang H., Tan Y., Zaia KA., Zhang S., Tsien JZ. (2004). Inducible and reversible NR1 Knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain. *Neuron*. 41:781-93.

- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*. 11: 327-335.
- Dash, PK., Hebert AE., Runyan JD. 2004. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Research*. 45:30-7.
- Davis, HP, Squire LR. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*. 96:518-59.
- De la Cruz, Vanesa, Rodriguez-Ortiz, Carlos J., Balderas Israela, Bermudez-Rattoni, Federico. (2008). Medial temporal lobe structures participate differentially consolidation of safe and aversive taste memories. *European Journal of Neuroscience*. 28: 1377-1381.
- Dewer B., Pillon B., Pochon JB., Dubois B. 2001. Is the HM story only a "remote memory"? Some facts about hippocampus and memory in humans. *Behavioural Brain Research* 127:209-24.
- Dudai Y. (1989). The neurobiology of memory: Concepts findings trends Oxford University press, USA; p.p. 38-39.
- Dudai Y. (1996). Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron*. 17:367-70
- 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 Review of Psychology*. 55: 51-86.
- Encuentros <http://www.encuentros.uma.es/encuentros83/nmda.html>; consulta agosto, 12.
- Escobar, M.L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*. 852: 208-212.
- Fernández, J., y Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Clasificación de la memoria. En Bermúdez-Rattoni, F. y Prado-Alcalá, R. A. Memoria: Donde reside y cómo se forma. Trillas México.
- Frankland PW., Bontempi B., Talton LE., Kaczmarek L., Silva AJ. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881-3.
- Frankland PW., Bontempi B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Review Neuroscience*. 6:119-30.
- Frey, U. Morris, R. (1997). Synaptic tagging and long term potentiation. *Nature* 385: 533-536.
- Gallo M, Roldan G, Bures J. (1992). Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Brain Research*. 52(1):91-97.

- García-DeLaTorre P, Rodríguez-Ortiz CJ, Arreguin-Martínez JL, Cruz-Castaneda P, Bermúdez-Rattoni F. 2009. Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn Mem* 16:514-9
- García J., Kimmerl Dorf, D.J., Koelling, R.A. (1995). Conditioned taste aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*. 122: 157-158.
- Goodwin, J. (2008). A history of modern psychology third edition. John Wiley & sons, USA; p.p. 90-92.
- Gutierrez H, Hernández-Echeagaray E, Ramirez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*. 89(3):751-758.
- Gutiérrez, R., De la Cruz, V., Rodríguez-Ortiz, C.J., Bermúdez-Rattoni, F. 2004. Perirhinal Cortex Muscarinic Receptor Blockade Impairs Taste Recognition Memory Formation. *Learning & Memory*. 11: 95-101.
- Hawkins, R., Kandel, E., Bailey, C. (2006). Molecular mechanisms of memory storage in Aplysia, *Biological Bulletin*, 210, 174-191.
- Jo YS. And Lee I. (2010). Disconnection of the Hippocampal- Perirhinal Cortical Circuits Severely Disrupts Object-Place Paired Associative Memory. *The Journal of Neuroscience*. 30 (29): 9850-9858.
- Kandel E. (2001) The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Neuroscience*. 294: 1030-1038.
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. (2000). Principles of neural science, Mc Graw-Hill, New York.
- Kesner, P. y Rogers, J. (2004). An analysis of independence and interactions of brain substrates that subserve multiple attributes, memory system and underlying processes. *Neurobiology of learning and memory*. 82: 199-215.
- Kim JJ., Fanselow MS. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 256:675-7.
- Kim JJ., Fanselow MS., DeCola JP., Landeira-Fernandez J. (1992). Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the N-methyl-D-aspartate antagonist APV. *Behaviour Neuroscience* 106:591-6.
- Knowlton BJ., Fanselow MS. (1998). The hippocampus, consolidation and on-line memory. *Current Opinion Neurobiology*. 8(2):293-6.
- Krane RV., Sinnamon HM., Thomas GJ. (1976). Conditioned taste aversions and neophobia in rats with hippocampal lesions. *Journal of Comparative Physiological Psychology*. 90:680-93.

- Maren S., Aharonov G., Fanselow MS. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behaviour Brain Research*. 88:261-74.
- Markowitch HJ. (1995). Which brain regions are critically involved in the retrieval of old episodic memory?. *Brain Research Brain Research Review*. 21:117-27.
- Martin S.J., Clark R.E. (2007). The rodent hippocampus and spatial memory: From synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1-31.
- Mc Gaugh, J.L. (2000). Memory a century of consolidation. *Science*. 287: 248-287.
- Medline neuroscience <http://www.merriam-webster.com/medlineplus/neuroscience>; consulta diciembre, 2012.
- Micheau, J., & Riedel, G., (1999). Protein Kinases: which one is the memory molecule?. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55: 534-548.
- Milner B. (2005). The medial temporal-lobe amnesic syndrome. *Psychiatr Clin North Am* 28:599-611.
- Milner, B., Squire, L., Kandel, E. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20 (3): 445-468.
- Moosgan, S., Haider, N., Klugbauer, Adelsberger, H., Langwieser, N., Müller, J., Stuess, M., Marais, E., Shulla, V., Lacinova, L., Goebbles, S., Nave, K., Storm, D., Hofmann, F., Kleppisch, T. (2005). Role of Hippocampal Ca_v1.2 Ca²⁺ Channels in NMDA Receptor-Independent Synaptic Plasticity and Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience*. 25(43): 9883-9892.
- Morris RG., (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *The European Journal of Neuroscience*. 23(11):2829-2846
- Moscovitch M., Rosenbaum RS., Gilboa A., Addis DR., Westmacott R., et al. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy*. 207:35-66.
- Nadel L., Moscovitch M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion Neurobiology*. 7:217-27.
- Nadel L., Samsonovich A., Ryan L., Moscovitch M. (2000). Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus*. 10:352-68.
- Naghdi N., Majlessi N., Bozorgmehr T. (2003). The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. *Behaviour Brain Research*. 139:69-73.

- Paxinos, G., y Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, CA.
- Peña-Casanova, J. 2007. Neurología de la conducta y neuropsicología. Editorial médica Panamericana, España. Pag. 51.
- Ramirez-Amaya, V., Alvarez-Borda, B., Bermúdez-Rattoni, F. (1998). Differential effects of NMDA-induced lesions into the insular cortex and amygdala on the acquisition and evocation of conditioned immunosuppression. *Brain Behaviour Immunity*. 12(2): 149-60.
- Shema R., Sacktor TC., Dudai Y. (2007). Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science*. 317:951-3.
- Sheryl, SM., Nadler, J., Young, N.B., Perez, A., Holloway, P., Barbaro, R., Barbaro, J., West, L., Threadgill, D., Lauder, J. Magnuson, T., Crawley, J. (2007). Mouse Behavioral Tasks Relevant to Autism: Phenotypes of Ten Inbred Strains. *Behaviour Brain Research*. 10: 176(1):4-20.
- Squire, L.R. (1987) Memory and brain. Oxford University Press. New York.
- Squire, L., Kandel, E. (2009). Memory: from mind to molecules, Roberts & company publishers, second edition., USA pp 1-21, 256.
- Stehberg J., Simon F. (2010). Involvement of the insular cortex in retention of conditioned taste aversion is not time dependent. *Neurobiology of Learning and Memory*. 95(1):14-8.
- Tang Ya-Ping, Shimizu, E., Dube, G., Rampon, C., Kerchner G., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401: 63-69
- Vanelzakker, MB., Zoladz, PR., Thompson, VM., Park, CR., Halonen, JD., Spencer, RL., Diamond, DM. (2011). Influence of Pre-Training Predator Stress on the Expression of c-fos mRNA in the Hippocampus, Amygdala, and Striatum Following Long-Term Spatial. *Frontiers in Behavioural Neuroscience*.5: 30.
- Welzl, H., D'Adamo, P., y Lipp, H.P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behavioral Brain Research*. 125: 205-213.
- Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y y Kitamura, R. (1989). Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *J. Neurophysiol*. 61: 1244-1258.
- Yamamoto, T., Nagai, T., Shimura, T., Yasoshima, Y. (1998). Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn J Pharmacol*. 76 (4): 325-348.
- Yamamoto, T., Tsuyoshi, S., Noritaka, S., Yasunobu, Y., y Nobuyaki, S. (1994). Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioral Brain Reserch*. 65: 123-137.

Zola-Morgan, S. and Squire, L.R. (1990). The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*. 250: 288-290.

Zola, Stuart M., Squire, L., Teng, E., Stefanacci, L., Buffalo, E., Clark, R. (2000). Recognition Memory in Monkeys after Damage Limited to Hippocampal Region. *The journal of neuroscience*. 20(1): 451-463.