



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“LA ACTUALIZACIÓN DE LA MEMORIA DE
RECONOCIMIENTO DE OBJETOS EN RATAS ES
INDEPENDIENTE DE SU EVOCACIÓN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

ARMANDO FLORES TREJO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ARIANA ISRAELA BALDERAS MORENO



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.

Agradecimientos

Quisiera aprovechar este espacio para dedicar unas breves palabras a las personas que forman parte de mi vida.

Agradezco a mis padres por haber estado a mi lado incondicionalmente, por sembrar en mí las ganas de ser siempre mejor y de conocerme a mí mismo. Sin quererlo, me han puesto el reto de tener una familia tan hermosa como la suya.

Reconozco y valoro la participación de mi hermano Felipe en la edición de esta tesis. Su presencia y voluntad por apoyarme en todo, facilitaron el proceso. Solo espero estar a la altura del amor que me demuestra siempre.

No tengo muchos amigos, pero los que tengo son de oro y, aquí me tomaré la libertad de nombrarlos: Aarón, Misael, Héctor Tapia y Héctor Portillo quienes desde que los conozco me han permitido formar equipo en sus vidas y en el juego.

A Eduardo y Mario, porque su capacidad intelectual y su hambre de conocimiento sirven siempre como estímulo a mi razón.

A Liliana, a quien dedicarle un párrafo o toda esta tesis sería un injusto e inmerecido resumen del amor que le tengo, pero que a lo largo de mi vida, confío en que mis acciones y mis palabras sean suficientes para expresar ese inmenso sentimiento, porque a su lado he crecido y a su lado pasará el resto de mis días.

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 y, estuvo a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni. El proyecto fue dirigido por la Dra. Ariana Israela Balderas Moreno y, se realizó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM).

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

Febrero, 2012

ÍNDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	6
Aprendizaje y memoria	6
Paciente HM	8
Lóbulo temporal medial	9
Corteza perirrinal	10
CONSOLIDACIÓN	12
RECONSOLIDACIÓN	14
Función de la evocación en la reconsolidación	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
HIPÓTESIS	29

OBJETIVOS	30
MÉTODO	30
Sujetos	30
Cirugía e implantación de cánulas	30
Fármacos	31
Procedimiento de la microinyección	31
Equipo y material	32
Protocolo experimental	32
Análisis estadístico	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	47

RESUMEN

La reconsolidación se ha definido como un proceso mediante el cual la memoria previamente almacenada es reactivada y posteriormente estabilizada. Este proceso de reconsolidación incluye la actualización de un trazo de memoria que permite la integración de nueva información a un trazo previamente consolidado. Los antecedentes relacionados con la actualización de la memoria de reconocimiento de objetos (MRO) en ratas indicaban que esta tarea necesitaba de la evocación de la información para que la memoria pudiera ser actualizada, sin embargo, estudios posteriores demostraron que la evocación no era necesaria para que la información previamente consolidada pudiera ser reactivada y, por lo tanto, actualizada. Estudios relacionados con la tarea de MRO han demostrado la participación de la corteza perirrinal en la discriminación de los objetos familiares de aquellos que son novedosos.

El presente experimento probó la tarea de MRO en ratas, con un protocolo de actualización de la memoria. El experimento constó de tres fases: en la fase de muestra, a los animales se les presentaron dos objetos iguales; en la fase de reactivación se presentó un objeto familiar y se incorporó un objeto novedoso, en esta fase se hicieron las inyecciones de muscimol para bloquear la evocación y de anisomicina para bloquear la reconsolidación, ambos fármacos se inyectaron en la corteza perirrinal; en la fase de prueba se presentó un objeto familiar junto con otro objeto novedoso. Los resultados obtenidos mostraron que, a pesar de que la evocación de la memoria en una tarea de MRO en ratas era bloqueada por el efecto del muscimol, la memoria sí podía ser actualizada (el efecto amnésico de la anisomicina demostró que la información estaba siendo reactivada y, por lo tanto, podía verse interrumpida). La actualización de la memoria se podía estar dando sin la evocación de la misma, lo cual sugiere una disociación de estos dos procesos.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos se han visto en la necesidad de adaptarse al medio que los rodea, provocando que sus capacidades tanto físicas como cognoscitivas se modifiquen, creando una serie de estrategias y habilidades que los hacen resistentes y, por lo tanto, exitosos en términos adaptativos. En casi todas las especies podemos observar que estos cambios conductuales que presentan son gracias a la capacidad de retener información y recuperarla en el momento adecuado (Rosenzweig, 2003).

El aprendizaje y la memoria son capacidades cognoscitivas propias de las especies y su influencia en los seres vivos se ve reflejada tanto en cambios estructurales que ocurren dentro del organismo, así como en cambios conductuales reflejados en su comportamiento. Con el paso del tiempo se ha observado que tanto el aprendizaje como la memoria tienen una influencia muy importante en el estudio del comportamiento. Por lo tanto, es importante investigar con mayor profundidad el funcionamiento de estos dos procesos.

ANTECEDENTES

Aprendizaje y memoria

Kandel (2000) define el aprendizaje como la capacidad que tienen los organismos para adquirir información del medio. Por otra parte, al ser esta información perdurable en el organismo, la memoria se define como la capacidad de codificar, almacenar y recuperar dicha información.

Para entender mejor el funcionamiento de estos procesos, es importante comenzar por conocer cuáles fueron las primeras aproximaciones experimentales que han sido relacionadas con el aprendizaje y la memoria. El estudio experimental y sistemático de estos procesos tiene sus primeros registros en los trabajos realizados por Hermann Ebbinghaus en 1885 (citado por Gluck et al., 2008).

Al realizar curvas de aprendizaje y olvido, relacionando el tiempo de adquisición con la capacidad del recuerdo, Ebbinghaus describió los efectos de primacía y recencia como componentes de la memoria. Cuando a una serie de sujetos se les presentaba una lista de elementos para que la memorizaran, pasado cierto tiempo, los sujetos recordaban con mayor facilidad tanto los primeros elementos de la lista como los últimos. La curva de aprendizaje observada mostraba que la memoria se entendía como un proceso progresivo (con un mayor número de ensayos aumentaba la capacidad de retención) y que dentro de esta curva existía un número de elementos que se podía recordar con facilidad (aproximadamente 7), hecho que anticipó la división en una memoria a corto y otra a largo plazo. Ebbinghaus también describió que al memorizar una lista de palabras y después olvidarlas, la segunda vez que se intentaba memorizar la misma lista, resultaba más fácil y más rápido que la primera vez. Lo anterior indicó que la memoria no desaparece por completo, incluso cuando la información aprendida no puede ser recordada (Bermúdez Ratonni, 2001).

Las pruebas de la permanencia de la memoria en el sistema y la dependencia del tiempo en el almacenamiento de la información dieron pie a estudiar de manera más precisa estos procesos en condiciones de laboratorio.

El psicólogo William James, en una interpretación de los experimentos realizados por Ebbinghaus, propuso por primera vez una clasificación de la memoria con base en su duración. William James sostenía que el conocimiento que no ha abandonado nuestro pensamiento, es decir, que se mantiene en la consciencia, pertenece a la *memoria primaria*; por el contrario, aquella información que ha abandonado nuestro pensamiento presente, pero que puede ser recuperada de manera voluntaria en cualquier momento que se desee, pertenece a la *memoria secundaria* (citado por Tulving, 1991).

Tanto el tiempo como la permanencia, las formas de manifestar la información almacenada o los cambios a nivel celular que ocurren en el organismo, son características que nos ayudan a darle una clasificación adecuada a la memoria (Kandel, 2000). Una taxonomía aceptada y con actual vigencia, es aquella que se

basa tanto en su forma de manifestarse, como en su método de medición. Con base en estos parámetros, la memoria se divide en *memoria declarativa (explícita)* y *memoria no declarativa (implícita)* (Bermúdez-Rattoni, 2001).

En la memoria no declarativa, la medición se hace a partir de la conducta desplegada por el sujeto (un ejemplo de memoria no declarativa es el condicionamiento clásico). En la memoria declarativa, la medición se basa en la capacidad de un sujeto para recuperar de manera consciente la información que proviene de su experiencia, este tipo de memoria se divide a su vez en memoria episódica, relacionada con eventos vividos por el sujeto, y la memoria semántica que se refiere al conocimiento teórico del mundo (Tulving, 1991).

Otra clasificación de la memoria podría estar determinada según la región cerebral en la que se almacena. El estudio de las enfermedades que involucran un daño cerebral relacionado con la pérdida parcial o total de la memoria, como las amnesias, ha indicado que la memoria reside en regiones específicas del cerebro que podrían estar participando de manera directa o indirecta en su formación. Esta hipótesis se originó con el caso del paciente HM, el cual fue descrito en 1954 por Brenda Milner, sin embargo la relevancia del caso sigue estando vigente hasta nuestros tiempos.

Paciente HM

Al paciente HM se le realizó una intervención quirúrgica que consistió en la remoción bilateral del lóbulo temporal medial, con la intención de disminuir la frecuencia de los severos ataques de epilepsia que sufría, para que éste pudiera tener una vida funcional.

A pesar de que la cirugía logró disminuir la frecuencia de los ataques epilépticos, el paciente HM sufrió un daño en su capacidad para formar nuevos recuerdos a largo plazo. Esto quiere decir que el paciente, al momento de perder su atención de la actividad que estaba realizando, no podía recordar lo que estaba haciendo.

La inteligencia del paciente, así como su capacidad para desarrollar nuevas tareas no se vieron afectadas, sin embargo, era incapaz de formar nuevas memorias episódicas y semánticas a largo plazo de la información de lo que le sucedía a diario (Milner et al., 1998).

El estudio del paciente HM sugirió que la memoria no era estática y que ésta se encontraba localizada en distintas regiones del cerebro, lo cual involucraba la participación de múltiples sistemas que guardaban la información a corto y a largo plazo. Estos descubrimientos condujeron a la necesidad de crear un modelo que explicara cómo y dónde se almacenaba la memoria.

En 1968, Atkinson y Shiffrin (citado por Bermúdez-Rattoni, 2001) diseñaron un modelo estructural de la memoria, en el cual se proponía la existencia de tres tipos de almacenamiento de la información: memoria sensorial, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. Debido a que, como se describió en el caso del paciente HM, la remoción del lóbulo temporal medial provocó un daño en la memoria, es importante describir las estructuras que conforman esta región cerebral y su relación con la formación de la memoria.

Lóbulo temporal medial

El lóbulo temporal es una parte del cerebro localizada por debajo de los lóbulos frontal y parietal y frente al lóbulo occipital que incluye un sistema de estructuras anatómicamente relacionadas y esenciales para la formación de la memoria declarativa. En su parte medial se localizan diversas áreas entre las cuales se encuentran: la región hipocampal, la corteza perirrinal, la corteza entorrinal y la corteza parahipocampal (Squire et al., 2004).

El estudio de la participación del lóbulo temporal medial en la formación de la memoria ha podido demostrar las funciones específicas de los núcleos que lo componen. Un ejemplo de estas funciones es la memoria de reconocimiento, la cual se basa en la capacidad de identificar los estímulos familiares sobre aquellos

que son novedosos (Westerberg et al., 2011). Este tipo de memoria se puede medir en roedores mediante la tarea de reconocimiento de objetos (RO), tarea fundamentada en la tendencia natural de los roedores por explorar más los objetos novedosos que se encuentren en su ambiente sobre aquellos que les son familiares (Ennaceur, 2010).

En la tarea de RO se pueden identificar dos componentes funcionales que conforman la memoria de reconocimiento. Por un lado, la identificación de la novedad/familiaridad de los estímulos y por otro lado, el reconocimiento del contexto, es decir, dónde se identificaron los estímulos (ROC).

Experimentos que incluyen la tarea de RO han relacionado la participación de la corteza perirrinal e insular con la novedad/familiaridad y, el hipocampo en tareas que involucran la codificación de un contexto específico, es decir, el reconocimiento de objetos en contexto (Balderas et al., 2008).

Debido a que esta investigación utiliza la tarea de memoria de reconocimiento de objetos y la identificación de la novedad/familiaridad de los objetos, se debe hacer primero una descripción de la estructura encargada de la codificación de esta información en el sistema nervioso.

Corteza perirrinal

La corteza perirrinal es una estructura del lóbulo temporal medial que se ha relacionado tanto con la tarea de memoria de reconocimiento (Staresina, 2011), como en procesos de discriminación visual (Bussey et al., 2006). La activación de esta corteza se ha relacionado con el procesamiento de la información novedosa entrante y la comparación con la información previa, discriminando así la familiaridad que existe en dicha información. Estas conclusiones se obtuvieron a partir de estudios en los que lesiones de la corteza perirrinal impedían la realización de una tarea de identificación de la novedad/familiaridad de un estímulo (Bussey et al., 2006).

Se ha demostrado con estudios de electrofisiología e inmunohistoquímica, que la corteza perirrinal aumenta su activación cuando a un animal se le presenta un objeto novedoso, mientras que cuando se le presenta uno familiar, esta corteza mantiene su actividad basal (Wan et al., 1999).

También se ha observado que la corteza perirrinal y el hipocampo participan en la codificación de la memoria, sin embargo estos núcleos parecen tener una participación diferencial en las tareas de MRO y MRO en contexto (Abe et al., 2009).

En el 2008, Balderas y colaboradores realizaron un experimento usando la tarea de MRO y MRO en contexto, probando la participación de las cortezas perirrinal e insular, el hipocampo y la amígdala. La tarea de MRO consistió en la presentación de 2 objetos diferentes a una rata, con la finalidad de que se familiarizara con estos objetos. Al día siguiente, se le presentó un objeto del día anterior junto con un objeto novedoso. La diferencia de este protocolo con el de MRO en contexto consistió en que en éste último, el día de la prueba a la rata se le cambiaba el lugar en el que eran presentados los objetos. El experimento consistió en la inyección de un inhibidor de síntesis de proteínas inmediatamente después de la presentación de los objetos del primer día, ya que es en este momento en donde se da la consolidación de la memoria. Los resultados mostraron para la MRO que al inyectar el inhibidor de síntesis de proteínas en las cortezas perirrinal e insular, la memoria se veía afectada, mientras que la inyección de estos inhibidores en el hipocampo sólo tuvo el efecto amnésico esperado en la tarea de MRO en contexto.

Gracias a estos experimentos quedó demostrada la relevancia de la consolidación de la memoria que incluía una ventana temporal en la que se da la síntesis de proteínas, estabilizando el trazo de memoria.

CONSOLIDACIÓN

El proceso mediante el cual la memoria se almacena a largo plazo se conoce como consolidación. Este proceso involucra cambios estructurales a nivel sináptico en el organismo, dando lugar a un mejoramiento en la eficiencia sináptica y en la actualidad se ha descrito que para que se presente la consolidación, se requiere de la síntesis de nuevas proteínas (Bermúdez-Rattoni, 2001).

El término “consolidación de la memoria” fue acuñado en 1900 por los investigadores Müller & Pilzecker (citado por Dudai, 2004) quienes realizaron investigaciones en seres humanos, probando su capacidad de retención de una lista de sílabas. El experimento consistió en leerle a los sujetos una lista de 12 sílabas y después de 17 segundos o 6 minutos, se les leía otra lista completamente diferente que funcionaría como interferencia de la primera lista que debía ser retenida. La capacidad de retención se midió a la 1.5 h después de presentada la información. Las observaciones realizadas indicaron que los individuos aumentaban su capacidad de retención de la información adquirida conforme aumentaban los minutos entre la información a retener y la interferencia. Esta ventana temporal en la que aumentaba la capacidad de retención de los sujetos es definida como consolidación (Lechner et al., 1999). Partiendo de esta descripción, se sugiere que una memoria que ya ha sido consolidada y almacenada a largo plazo es resistente a cualquier tratamiento amnésico y, por lo tanto, es capaz de recuperarse a través del tiempo manifestándose a nivel conductual, proceso que se conoce como evocación de la memoria (Baddeley, 1999). Estos procesos describen la consolidación de la memoria a nivel conductual, sin embargo, se originan a nivel celular.

La consolidación de la información a nivel celular consiste en la activación de cascadas de señalización que conducen a la síntesis de nuevas proteínas, modificaciones neuronales y cambios plásticos a nivel sináptico (Dudai, 2004).

En 1966 los estudios de Agranoff (citado por Dudai, 2004) en el “pez dorado”, demostraron que la consolidación de un trazo de memoria podía verse interrumpida con la inyección de inhibidores de síntesis de proteínas, cuyo efecto amnésico se perdía si éstos se inyectaban varias horas después de presentada la información, suponiendo que existía una ventana temporal en donde se requería la síntesis de nuevas proteínas que consolidarían el trazo recién adquirido para su almacenamiento a largo plazo. Este proceso de almacenamiento de la información es una propiedad universal del sistema nervioso (Dudai, 2004).

Como ya se mencionó, la consolidación de la memoria es dependiente del tiempo, sin embargo, se ha propuesto que tanto la memoria a corto como a largo plazo están relacionadas entre sí como procesos que corren en paralelo (figura 1), rechazando la hipótesis que señalaba que un tipo de memoria dependía de otro (McGaugh, 2000).

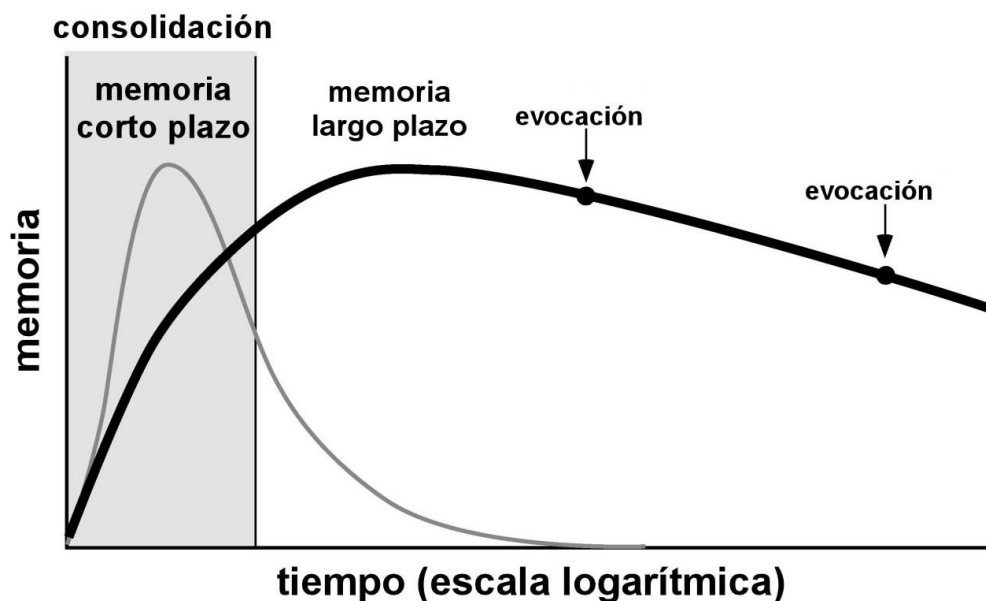


Figura 1. Fases de la Memoria. La figura muestra la entrada de información y su almacenamiento como memoria a corto y a largo plazo. Cuando la memoria a corto plazo pasa por la fase de consolidación muestra una permanencia temporal mayor (memoria a largo plazo). La información almacenada es accesible mediante su evocación (modificado de Dudai, 2004.)

El modelo de consolidación sostiene que este proceso ocurre una sola vez, es decir, después de que la información se ha consolidado, la memoria queda almacenada de manera permanente (McGaugh, 2000). Sin embargo, se ha observado que la información ya consolidada, al contrario de lo que se había afirmado, puede ser modificada llegando incluso a su pérdida total. Para que esta información pueda consolidarse de nuevo, se requiere de un proceso conocido como reconsolidación (Dudai, 2004).

RECONSOLIDACIÓN

La teoría de la reconsolidación propone que la memoria que ya había sido consolidada puede entrar en un estado dinámico y lábil en vez permanecer estática como antes se pensaba (Nader, 2009). Mediante la evocación de la memoria, el trazo previamente consolidado parece entrar en un estado lábil, volviéndose susceptible de su fortalecimiento, su extinción, o bien, de agregarle nueva información, proceso que se conoce como actualización (Han-Szu & Morris, 2010).

La información retomada apoya la propuesta de Lewis de 1979, la cual indica que los trazos mnémicos se estabilizan mediante su consolidación, sin embargo, mediante la recuperación de esta memoria el trazo se desestabiliza, permitiendo que se echen a andar los mecanismos de reconsolidación, los cuales regresarán de nuevo a la memoria a un estado inactivo (figura 2) (citado en Nader, 2009).

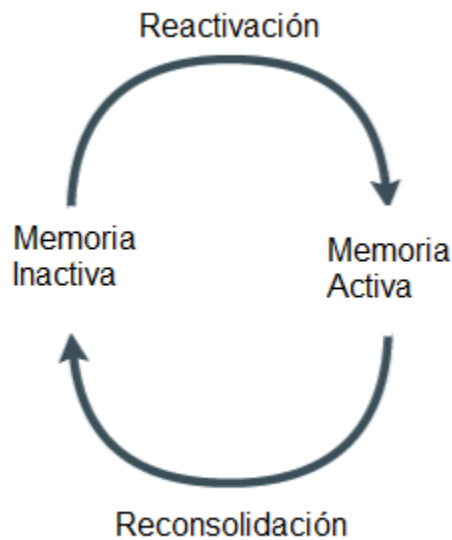


Figura 2. Modelo de Lewis. Después de la reconsolidación, la memoria inactiva puede ser recuperada, regresando nuevamente a un estado activo (Modificado de Nader, 2009).

En 1968, Misanin y colaboradores observaron el efecto de los choques electroconvulsivos (CEV) en la consolidación de la memoria en una tarea de condicionamiento al miedo en ratas. La tarea de condicionamiento al miedo consiste en la asociación de un tono (estímulo condicionado; EC) y un choque eléctrico en las patas (estímulo incondicionado; EI), lo cual produce una respuesta incondicionada (RI). Esta RI consiste en que la rata disminuya su capacidad de reacción ante cualquier estímulo que se le presente, lo que se conoce como “congelamiento”. Una vez que la rata asocia el EC con el EI, al presentarle sólo el EC la rata tendrá una respuesta condicionada, que en este caso es el congelamiento.

El experimento consistió en dividir a los sujetos en 2 grupos cuyas condiciones fueron las siguientes: para el primer grupo, se estableció el condicionamiento (EC-EI) y se probó la memoria al siguiente día mediante un contador de lengüetazos que podía dar la rata sin restricciones. La respuesta esperada era que las ratas al

presentarles el EC, disminuyeran el número de lengüetazos que daban al bebedero, esto debido a que el condicionamiento presentado induciría al animal a presentar una respuesta de congelamiento que entre otras cosas impide la actividad del lengüeteo.

El segundo grupo incluiría, inmediatamente después de establecido el condicionamiento, la presentación de los CEV. Los resultados obtenidos mostraron que a las ratas del primer grupo, que únicamente recibieron la asociación del tono con el choque eléctrico en las patas (EC-EI), al presentarles sólo el EC al día siguiente, disminuyeron el número de lengüetazos que le daban al bebedero. Para el segundo grupo que recibió los CEV después de la asociación EC-EI, al día siguiente, al presentarles el EC, las ratas no disminuían el número de lengüetazos que le daban al bebedero. Esto sugirió que los CEV bloqueaban la formación del aprendizaje e interrumpían la consolidación de la memoria, funcionando como agente amnésico.

Con base en estos resultados, Misanin y colaboradores (1968) también quisieron probar si la información ya consolidada era susceptible de ser modificada por el mismo agente amnésico que bloqueaba la consolidación, es decir, los CEV.

Para esto, se desarrolló un protocolo de evocación de la memoria. Utilizando la misma tarea de condicionamiento al miedo, primero estableciendo el aprendizaje (EC-EI) y al día siguiente reactivando la memoria presentando sólo el EC e inmediatamente después presentando los CEV, la prueba se realizó al tercer día del experimento presentando únicamente el EC. La conducta esperada era que los animales que no recibieran los CEV, al presentarles el EC al tercer día, mostraran una disminución en el contador de lengüetazos al bebedero.

Los resultados observados 24 horas después de la evocación de la memoria mostraron que para el grupo control, es decir el grupo de animales que no recibió CEV, disminuía el número de lengüetazos que daban al bebedero al momento de presentar el EC, es decir, se inhibía su respuesta. Sin embargo, los animales aumentaban el número de lengüetazos al bebedero si se les presentaba el EC

seguido de la aplicación de los CEV, lo cual reflejaba una alteración del aprendizaje establecido (el congelamiento y la disminución de los lengüetazos). Este fenómeno podría explicarse suponiendo que la reactivación de la memoria previamente consolidada (producida por la presentación del EC) volvía al trazo de memoria lábil y susceptible de modificarse y, que la aplicación inmediata de los CEV dañaba dicho trazo.

Para probar si la reactivación de la memoria producida por la presencia del EC era necesaria para bloquear el aprendizaje, se utilizó un grupo control en donde al día siguiente del condicionamiento no se le presentó el EC, únicamente se le aplicó los CEV. Los resultados del día siguiente mostraron que los animales mantenían intacto el aprendizaje del condicionamiento.

Las conclusiones obtenidas por Misanin y colaboradores (1968) consistieron en que al reactivar la memoria previamente consolidada, ésta entraba en un estado lábil, cuyas implicaciones parecían establecerse principalmente en la desestabilización del trazo mnemónico y, por consecuencia, en su posible alteración mediante la presencia de CEV. En este caso, la desestabilización del trazo de memoria también representa la necesidad de que se eche a andar el proceso de reconsolidación que, entre otras cosas, implica la síntesis de nuevas proteínas para la estabilización de dicho trazo.

Este experimento fue uno de los primeros que demostró la desestabilización de un trazo de memoria que supuestamente no era posible de modificarse.

En la actualidad se ha establecido que la inyección de inhibidores de la síntesis de proteínas como la anisomicina, durante la ventana temporal en que se da la consolidación de la información, altera la formación de la memoria a largo plazo. El uso de estos fármacos fuera de dicha ventana temporal, no tienen ningún efecto sobre la consolidación de la memoria (Sara, 2006).

Tomando en cuenta que los inhibidores de la síntesis de proteínas bloqueaban la consolidación de la memoria (Sara, 2006) y que la reactivación de la memoria ya consolidada volvía el trazo lábil y susceptible de su modificación (Misanin et al.,

1968), Nader (2000) intentó probar el efecto de la inyección del inhibidor de síntesis de proteínas anisomicina en la amígdala basolateral (ABL), en un protocolo de reconsolidación de la memoria.

Para el desarrollo de este experimento se utilizó la tarea de condicionamiento al miedo, tarea que involucra una respuesta emocional en la rata. El criterio de medición en esta tarea fue mediante el porcentaje de congelamiento que tiene el animal al momento de presentarle el EC.

El experimento consistió en la asociación de un tono con el choque (EC-EI). Al día siguiente se reactivó la memoria con la presencia del EC e inmediatamente después se inyectó anisomicina o su solución vehículo (líquido céfalo raquídeo artificial; ACSF) en la amígdala basolateral, en dos diferentes dosis (baja de 6.2 μ l por 0.5 μ l, y alta de 62.5 μ l por 0.5 μ l).

La prueba se realizó al tercer día con la presencia del EC. La respuesta esperada era que el grupo sin manipulación farmacológica, el día de la prueba, al presentarle el EC mostrara un aumento en su porcentaje de congelamiento.

Los resultados obtenidos mostraron que el grupo que recibió la inyección de ACSF y el grupo que recibió la inyección de anisomicina en dosis bajas, al presentar el EC el día de la prueba, ambos grupos presentaron un aumento en el porcentaje de congelamiento de entre 60 y 80 %; mientras que el grupo que recibió la dosis alta de anisomicina, al presentar el EC no presentó este aumento en el porcentaje de congelamiento (manteniéndose entre 20 y 40 %) (figura 3).

Para saber si la reactivación era necesaria para que se observara este daño en la memoria, al segundo día del experimento se usó un grupo control al cual se le realizó el proceso de condicionamiento pero no se le reactivó la memoria, recibiendo la inyección de anisomicina sola. Este grupo mostró el aprendizaje original intacto, mostrando un alto porcentaje de congelamiento con la presencia del EC el día de la prueba (Nader, 2000).

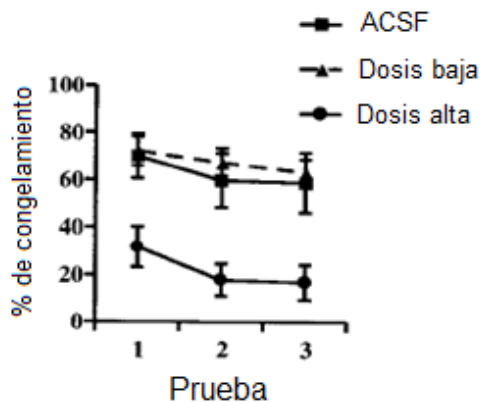


Figura 3. Prueba con dosis baja (6.2 μ l por 0.5 μ l) y dosis alta (62.5 μ l por 0.5 μ l) de anisomicina. La dosis alta de anisomicina tuvo un efecto en la reconsolidación de la tarea del condicionamiento al miedo (Nader, 2000).

Se ha pensado que aunque el proceso de reconsolidación parezca mimetizar los mecanismos correspondientes a la consolidación, esto no es necesariamente cierto. Prueba de ello es el experimento de Lima y colaboradores (2009), donde se utilizó la tarea de MRO.

Como ya se había mencionado, en esta tarea los resultados esperados consisten en que al presentarle 2 objetos novedosos a una rata, ésta explore ambos el mismo tiempo, sin embargo al día siguiente, cuando se le presente un objeto novedoso junto con un objeto presentado el día anterior (objeto familiar), el animal explore más el objeto novedoso.

Lima y colaboradores (2009) encontraron que para la tarea de MRO, al inyectar anisomicina en la corteza entorrinal inmediatamente después de presentarle al animal los objetos novedosos, al día siguiente, la rata no era capaz de reconocer el objeto familiar, lo cual mostraba un daño en la consolidación de la memoria. Sin embargo, con un protocolo que incluía la reactivación de la memoria con los objetos del aprendizaje original y la prueba con la presentación de un objeto novedoso y, la inyección de anisomicina después de la reactivación, se observaba

que la rata podía reconocer los objetos presentados en la fase de muestra y de reactivación explorándolos el mismo tiempo, es decir, el efecto amnésico de la anisomicina no se presentaba (Lima et al., 2009).

Esta diferencia señala la participación de la corteza entorrinal en la consolidación de la tarea de MRO, sin embargo, esto no sucede en la reconsolidación de dicha tarea, lo cual sugiere que los procesos de consolidación y reconsolidación podrían no estar requiriendo la participación de las mismas regiones cerebrales para que puedan llevarse a cabo (Lima et al., 2009).

Estas propuestas encaminaron las investigaciones a buscar las diferencias entre estos dos procesos a nivel celular. En el 2008, Bozon y colaboradores realizaron un estudio con ratones transgénicos a los que se les inactivaba la expresión del gen zif-268. Este gen de expresión temprana se ha visto relacionado con la plasticidad sináptica y con la consolidación de la memoria, mostrando un aumento en su expresión que desencadena la inducción de potenciales a largo plazo (LTP) y el mantenimiento de la información en el sistema. Por otro lado, se ha observado que la inactivación del gen zif268 evita que se presente la plasticidad sináptica, medida en el giro dentado del hipocampo y la consolidación de memorias a largo plazo (Jones et al., 2001).

Esta información llevó a los investigadores a observar si la expresión del gen zif-268 también era necesaria para la reconsolidación de una memoria de reconocimiento de objetos. Bozon y colaboradores (2003) encontraron que los ratones que no expresaban zif-268 eran capaces de realizar la tarea de MRO en el protocolo de consolidación; sin embargo, al reactivar la memoria y probarla a las 24 horas (protocolo de reconsolidación), los animales eran incapaces de realizar dicha tarea, concluyendo así que la expresión del gen zif-268 no era necesaria para consolidar la entrada de nueva información, pero sí para la reconsolidación de la misma (Bozon et al., 2003). En el grupo control, ambos procesos se realizaban adecuadamente.

Función de la evocación en la reconsolidación

Se ha sugerido que la evocación es un desencadenante para que se echen a andar los mecanismos de actualización y reconsolidación de un trazo de memoria (Rossato et al., 2007). Experimentos enfocados en el papel que juega la evocación de la memoria, han demostrado que ésta debe incluir la incorporación de nueva información al trazo previamente consolidado para que éste pueda ser modificado o bien, fortalecido (Lee, 2008; Rodríguez-Ortíz et al., 2005).

Rossato y colaboradores (2007) realizaron una serie de experimentos con un protocolo de reconsolidación en la tarea de MRO. Estos experimentos se llevaron a cabo con la finalidad de evaluar el papel del hipocampo en la reconsolidación de un trazo de memoria.

El protocolo de reconsolidación consistió en tres fases, una de muestra, una de reactivación y una de prueba. En la fase de muestra se presentaron 2 objetos novedosos (A-B) y en el día de la fase de reactivación se repitieron los mismos objetos (A-B). En la fase de prueba se presentó uno de los objetos presentados en las fases anteriores (A) junto con un objeto novedoso (C).

Para comprobar en dónde se encontraba el límite de la ventana temporal en el que se daba la síntesis de proteínas para que se consolidara la información, la inyección de la anisomicina se realizó a los 0, 180 y 360 minutos después de la fase de reactivación.

Los resultados mostraron que en ambos grupos (anisomicina y vehículo), los animales fueron capaces de reconocer el objeto A como familiar, mostrando una exploración mayor por el objeto C, sin importar los tiempos de inyección (figura 4).

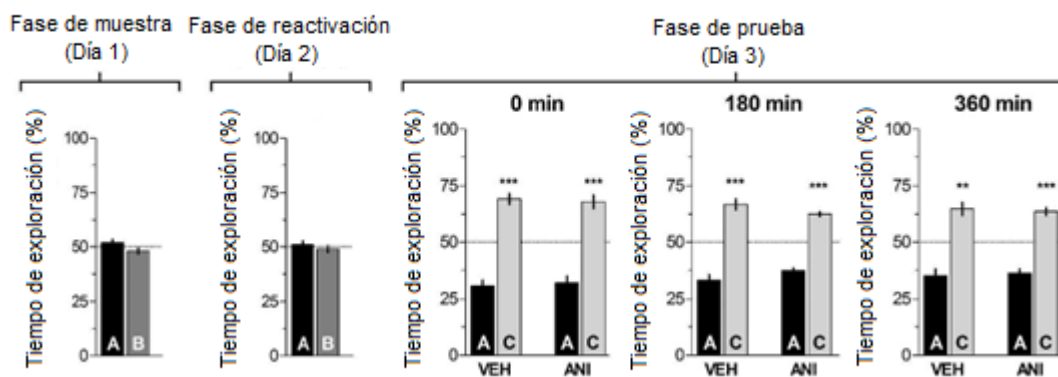


Figura 4. Debido a que la fase de reactivación consistió en presentar los mismos objetos de la fase de muestra, la anisomicina no tuvo ningún efecto (Rossato et al, 2007).

Al analizar el protocolo de reconsolidación surgieron observaciones interesantes. Por un lado, al presentar los mismos objetos el día de la fase de muestra y el día de la fase reactivación se observó que la anisomicina no tenía ningún efecto, lo que indicaba que la reactivación no se presentaba con la repetición del aprendizaje original.

Por otro lado, durante la reactivación de la memoria, la síntesis de proteínas produce un efecto protector y de reforzamiento del trazo previamente consolidado (Rossato et al., 2007). Sin embargo, también se ha demostrado que esta reactivación tiene un papel de “actualización del trazo” que implicaría la incorporación de nuevos componentes a la memoria original (Rodríguez-Ortiz et al., 2005).

Tomando en cuenta esta información, para agregar nueva información al trazo, Rossato y colaboradores (2007) desarrollaron un protocolo de reconsolidación para la tarea de MRO que incluyera un componente novedoso (A-C,) para el día de la fase de reactivación y el día de la prueba se incluyó otro objeto novedoso (A-D, B-D y C-D).

Los resultados mostraron que la anisomicina bloqueó la consolidación del objeto novedoso presentado el día de la reactivación (C) y la reconsolidación de aquel que había sido reactivado (A) (figura 5).

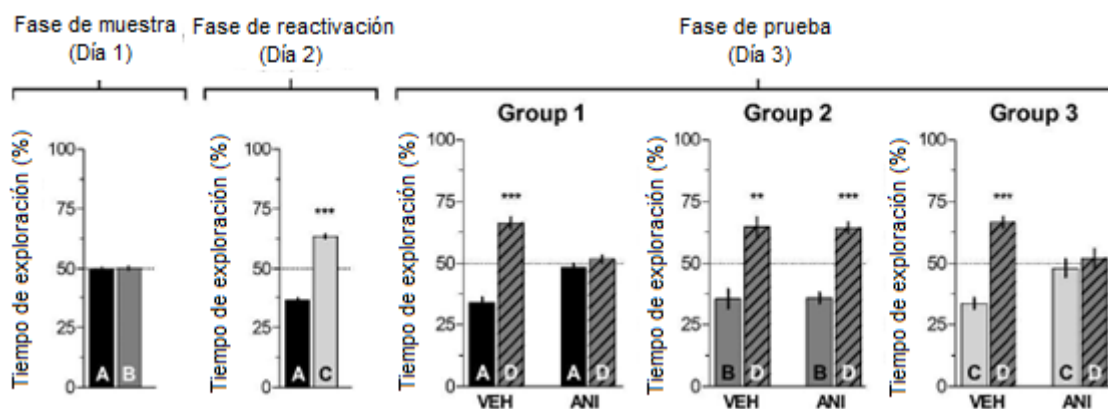


Figura 5. La anisomicina bloqueó la memoria del objeto A, excepto en el grupo 2, debido a que el objeto B no fue reactivado (Rossato et al, 2007).

Los resultados de este experimento mostraron que la evocación de la memoria en la tarea de RO es necesaria para que la información previamente consolidada pueda entrar en un estado lábil que le permita fortalecerse mediante su actualización, sin embargo, durante el proceso de evocación, se requiere de la entrada de nueva información al trazo previamente consolidado para que este pueda ser actualizado (Rossato et al., 2007).

Hasta este momento, los conceptos de reactivación y evocación de la memoria manejados en los experimentos de reconsolidación, se entienden como sinónimos o como dependientes uno del otro, es decir, para que los mecanismos de reconsolidación y actualización de un trazo de memoria puedan echarse a andar, es necesaria la reactivación del trazo mnemónico producida mediante su evocación (Nader et al., 2000, Rossato et al., 2007).

Partiendo de estos hechos, Ben Mamou y colaboradores (2006) investigaron la participación del sistema glutamatérgico (actividad de los receptores NMDA y AMPA) en la reactivación y reconsolidación de la memoria de condicionamiento al miedo.

Se sabe que los receptores glutamatérgicos son necesarios para la consolidación de este tipo de aprendizaje (Ben Mamou et al., 2006), por lo que se esperaría su participación en la reactivación y reconsolidación del mismo trazo de memoria. Si esto es cierto, la inhibición de estos receptores antes de la reactivación del trazo, produciría un efecto de bloqueo ante la presencia de algún agente amnésico presentado inmediatamente después de la reactivación.

El entrenamiento consistió en el apareamiento de dos estímulos (tono y choque) para establecer el condicionamiento, la reactivación se llevó a cabo únicamente con la presentación del EC (tono) y la prueba se realizó de la misma forma a las 24 horas.

Las condiciones farmacológicas fueron las siguientes: para el bloqueo de los receptores NMDA y AMPA se inyectó ifenprodil antes de la reactivación y, para probar si la memoria había entrado en una fase lábil, se inyectó anisomicina inmediatamente después de la reactivación (Figura 9).

Los resultados se graficaron tomando en cuenta el porcentaje de congelamiento del animal al momento de la reactivación (presentación del EC) y, en una prueba a las 24 horas (PR-LTM).

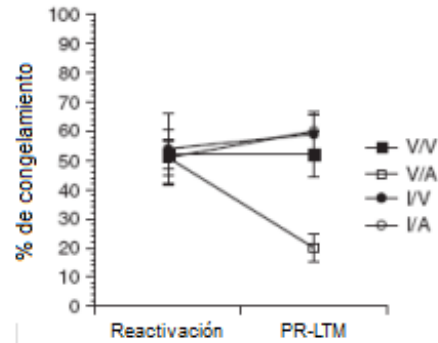


Figura 9. Los grupos fueron vehículo/vehículo (V/V), vehículo/anisomicina (V/A), ifenprodil/vehículo (I/V) e ifenprodil/anisomicina (I/A). El único grupo que muestra una disminución en el porcentaje de congelamiento es el grupo inyectado con ifenprodil (I/A). (Ben Mamou et al., 2006).

Los resultados mostraron que el ifenprodil funcionó como un agente que bloqueó el efecto amnésico de la anisomicina en la memoria, al momento de su reactivación (grupo I/A). Debido a que el ifenprodil actuaba como un inhibidor no selectivo del sistema glutamatérgico, esta observación llevó a probar inhibidores selectivos de los receptores NMDA y AMPA para la reactivación del condicionamiento auditivo al miedo.

La sugerencia de que los receptores NMDA están involucrados en la reactivación de un trazo de memoria de condicionamiento al miedo llevó a probar, mediante un antagonista selectivo de estos receptores (APV), su participación en la reactivación del condicionamiento auditivo al miedo.

El protocolo se realizó de la misma forma que en el experimento anterior, probando la memoria a las 24 horas (Post-reactivación de la memoria a largo plazo) (figura 10).

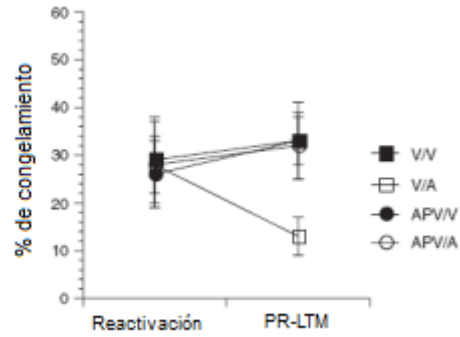


Figura 10. Los grupos fueron vehículo/vehículo (V/V), vehículo/anisomicina (V/A), APV/vehículo (APV/V) y APV/anisomicina (APV/A). La inyección de APV antes de la reactivación tuvo el mismo efecto que la del ifenprodil, el porcentaje de congelamiento el día de la reactivación no varía para ambas condiciones (vehículo y APV) (Ben Mamou et al., 2006).

Los resultados de estos experimentos indican que los receptores NMDA en la amígdala basolateral son determinantes para la formación del condicionamiento al miedo, protegiendo el trazo de memoria previamente establecido del efecto amnésico de la anisomicina.

Tomando en cuenta que el ifenprodil es un antagonista no selectivo de los recetores a glutamato, el siguiente paso fue probar la participación de los receptores AMPA en la misma tarea, utilizando CNQX, que es un antagonista selectivo a estos receptores (figura 11).

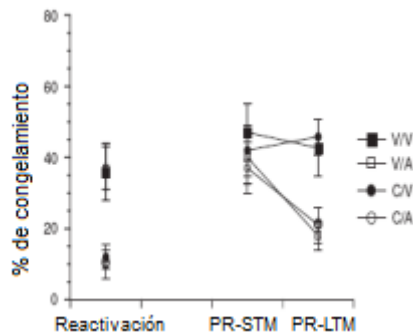


Figura 11. Los grupos fueron vehículo/vehículo (V/V), vehículo/anisomicina (V/A), CNQX/vehículo (C/V) y CNQX/anisomicina (C/A). El porcentaje de congelamiento en las ratas que fueron inyectadas con CNQX/anisomicina o CNQX/vehículo es menor que el de las ratas vehículo/vehículo y vehículo/anisomicina el día de la reactivación, sin embargo, para el día de la prueba, estas ratas mostraron bajo porcentaje de congelamiento en comparación con el grupo vehículo/anisomicina y el de vehículo/vehículo, la prueba de la memoria a corto plazo (PS-LTM) no se vio modificada (Ben Mamou et al., 2006).

Por un lado, los receptores AMPA parecen estar relacionados con la evocación conductual del trazo de memoria previamente establecido, sin embargo, esto no indica que el trazo no haya sido reactivado. Esta reactivación parece depender de los receptores NMDA, cuya actividad permite que la memoria entre en una fase lábil, en la que se necesita de la síntesis de nuevas proteínas para su reestabilización, sin la necesidad de ser evocada. Los resultados de estos experimentos muestran que, al contrario de lo que se pensaba, la reactivación y la evocación son procesos diferentes y que uno no depende forzosamente del otro. Esta disociación de los términos se observa en el papel diferencial de la tarea del condicionamiento auditivo al miedo para los receptores AMPA y NMDA.

Como conclusión de estos antecedentes se puede decir que la memoria, una vez consolidada, a pesar de lo que se tenía pensado, puede ser reactivada sin que exista evocación (un despliegue de la conducta observable en la rata) de la misma y, por lo tanto, regresar a un estado lábil en donde la intervención, ya sea a nivel sistémico (mediante la presentación de los CEV) o farmacológico (la inyección de

inhibidores de síntesis de proteínas), produciría un daño en el trazo. Sin embargo, también se ha visto que la región cerebral relacionada con la tarea a realizar es determinante para la disociación de los procesos de reactivación (activación del trazo) y evocación (despliegue de la conducta).

Debido a que la corteza perirrinal es considerada una región de asociación multimodal, su participación junto con la de otras estructuras del lóbulo temporal medial, es determinante en el reconocimiento de los estímulos familiares sobre los novedosos presentados en una tarea de MRO (Balderas et al., 2008).

Experimentos que involucran la tarea de MRO han relacionado a la corteza perirrinal y al sistema GABAérgico en la adquisición y la consolidación de esta tarea, además de que inyecciones de muscimol (agonista de los receptores GABAA) impiden la reconsolidación del trazo previamente consolidado, llevándolo a la pérdida de la información (Winters et al., 2010).

Por otro lado, se ha observado que el muscimol afecta la evocación explícita tanto de las tareas de condicionamiento al miedo como de prevención pasiva cuando se inyecta en el hipocampo dorsal y una vez que se pierde el efecto del muscimol, la memoria se muestra intacta (Corcoran y Maren, 2001, Holt y Maren, 1999).

Se ha reportado que la reactivación de la memoria al ser evocada, debe incluir la entrada de nueva información al trazo previamente consolidado (Rossato et al., 2007, Rodríguez-Ortíz et al., 2005), sin embargo, se ha observado que a pesar de bloquear la evocación, la memoria al ser reactivada sigue siendo susceptible de ser modificada (Ben Mamou et al., 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que la evocación de la memoria se manifiesta con el despliegue de la conducta aprendida y que la reactivación de la misma se comprueba con la modificación de un trazo previamente consolidado, se ha propuesto que la evocación echa a andar mecanismos de actualización de las memorias

previamente consolidadas (Misanin, 1968 & Nader, 2000). Así mismo, se ha observado que el bloqueo de la evocación de la memoria no evita que el trazo se reactive y la memoria sea actualizada (Ben Mamou & Nader, 2006).

Por otro lado, se sabe que al bloquear las funciones de la corteza perirrinial en la realización de la tarea de MRO, los sujetos son incapaces de distinguir los objetos familiares en comparación con los novedosos, explorando ambos el mismo tiempo. Este bloqueo de la corteza perirrinial no afecta el reconocimiento de la novedad, ya que en este tipo de tarea aumenta el índice de exploración cuando sólo se presentan objetos novedosos. La corteza perirrinial es únicamente la encargada de distinguir la familiaridad de un estímulo cuando se compara con un objeto novedoso (Albasser et al., 2011).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En la disociación planteada de los procesos de evocación y reactivación, ¿Es necesaria la evocación para que se echen a andar los mecanismos de actualización de un trazo de memoria en la corteza perirrinial o, al activar los receptores GABAA de la corteza perirrinial y bloquear la evocación, es la reactivación de la misma suficiente para que se dé la actualización?

HIPÓTESIS

En una tarea de reconocimiento de objetos, la incorporación de nueva información a un trazo de memoria previamente consolidado, es decir, la reactivación de la memoria, desencadena su actualización, esto a pesar de que la activación de los receptores GABAA de la corteza perirrinial impidan la evocación de dicha tarea. La inyección de anisomicina en la corteza perirrinial demostraría una activación del trazo de memoria previamente consolidado.

OBJETIVOS

Determinar si la evocación es necesaria para la actualización de la memoria de reconocimiento de objetos.

Para probar que la inhibición de la evocación de una tarea no implica que la información sea reactivada, determinar los efectos de la anisomicina en la corteza perirrinal, administrada inmediatamente después de la evocación de un trazo de memoria en la actualización de una tarea de reconocimiento de objetos.

Observar si la inhibición de síntesis de proteínas en la corteza perirrinal, inducida inmediatamente después de la evocación tiene el mismo efecto en ratas capaces de evocar que en ratas cuya evocación es bloqueada mediante el muscimol.

Determinar si la síntesis de nuevas proteínas en la corteza perirrinal al momento de la reactivación de la tarea de reconocimiento de objetos es necesaria para que la memoria pueda ser actualizada.

MÉTODO

Sujetos:

Se utilizaron 34 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250 a 300 gramos, de aproximadamente 10 semanas de vida, criadas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los animales se mantuvieron en cajas individuales con un ciclo de luz-oscuridad 12 h:12 h, encendiéndose las luces a las ocho de la mañana. Las ratas fueron alojadas en cajas de acrílico individuales donde tuvieron acceso sin restricción a comida y agua. La fase experimental se realizó durante la fase de luz.

Cirugía e implantación de cánulas:

Todos los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina (76 mg/ Kg) y xilazina (8 mg/ Kg). La cirugía se realizó empleando el

procedimiento de cirugía estereotáxica estándar, en el cual, una vez realizadas las trepanaciones con una fresa dental, se implantaron cánulas de 23 Ga y de 12 mm de largo, las cuales fueron fijadas al cráneo con dos tornillos y cemento dental de acuerdo a las siguientes coordenadas estereotáxicas (mm):

- Corteza perirrinal: posterior 3, lateral \pm 6.5 y ventral 5 (Paxinos & Watson 2007).

Las cánulas guías se colocaron 2 mm arriba del área de interés para evitar lesiones y dentro de las mismas se insertaron mandriles para evitar que se taparan. Al final del procedimiento se les aplicó a las ratas penicilina como antibiótico. Para tener una adecuada recuperación posterior a la cirugía, los animales contaron con acceso libre de agua y comida durante 13 días.

Fármacos

Los fármacos que se utilizaron fueron: para bloquear la síntesis de proteínas en la corteza perirrinal se utilizó anisomicina (Sigma) a una concentración de 120 mg/ml, que se sabe tiene efectos en la consolidación y el vehículo que se utilizó para este fármaco fue líquido cefaloraquídeo artificial (ACSF mM: 125 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄ · H₂O, 1.5 MgSO₄ · 7H₂O, 26 NaHCO₃, 10 glucosa, 2.5 CaCl₂). Para bloquear la evocación de la memoria se utilizó como agonista de los receptores GABA_A, muscimol (Sigma) en una concentración de 2.4 mg/ml y su vehículo correspondiente fue solución salina fisiológica (NaCl 0.9%).

Procedimiento de la microinyección

La inyección de los fármacos y sus vehículos correspondientes se realizó mediante el uso de jeringas Hamilton de 10 μ l de manera bilateral conectadas a agujas dentales introducidas en las cánulas guía, mismas que rebasaron por 2 mm el sitio donde terminó la cánula. Se inyectó 1 μ l por hemisferio con una bomba automática de microinyección a una tasa de 1 μ l/min, dejando el inyector durante un minuto más para permitir la completa difusión del fármaco en el tejido.

Equipo y material

Los aparatos que se utilizaron durante el experimento fueron: una caja de madera pintada de gris (40 X 40 cm, 60 cm de alto) cubierto el piso con aserrín e iluminada con luz tenue (foco de 60 W) que funcionó para colocar los objetos. Una cámara de video colocada arriba de la caja para grabar la exploración de las ratas (la cámara estaba conectada a un DVD/TV). Estos aparatos se encontraban en un cuarto con temperatura controlada a 21° C y ambientado con ruido blanco para aislarlo del ruido exterior.

Como objetos a explorar se utilizaron un foco de luz blanca, un frasco de vidrio transparente y un foco de luz blanca en forma de espiral (todos hechos de vidrio pero diferentes en color y forma), que fueron adheridos al suelo de la caja con velcro.

Con la finalidad de demostrar que las ratas no mostraban preferencia por algún objeto en particular, antes de realizar el experimento se utilizó a un grupo control que no formó parte de los datos presentados, al que se le aplicó una prueba de exploración de los objetos. En esta prueba se colocó en la caja de exploración tanto la combinación frasco-foco, como la combinación frasco-foco en espiral, siendo la duración de esta prueba de 5 minutos. Los resultados se obtuvieron cronometrando el tiempo que las ratas pasaron explorando cada objeto. Estos resultados mostraron un porcentaje de exploración del 50% para cada objeto, lo cual indicó que no existía preferencia alguna por parte de los roedores hacia los objetos presentados.

Protocolo Experimental

Manipulación y fase de habituación

Para disminuir los niveles de estrés de los roedores en las inyecciones de los fármacos, cada rata se manipuló por 1 minuto al día durante 5 días consecutivos. Después de la manipulación, a las ratas se les permitió explorar la caja vacía durante 3 minutos con la finalidad de que éstas se familiarizaran con el contexto y

disminuyeran su estrés provocado al estar en un contexto novedoso. Después de cada habituación se limpió la caja quitando el excremento y removiendo el aserrín para evitar señales olfativas.

Fase de muestra

La rata se colocó en la caja en el lado opuesto de los objetos dando la cara hacia la pared. Se le permitió a la rata explorar dos objetos idénticos (A1 y A2) durante 5 min (figura 12) y se midió el tiempo que pasaba explorando cada uno de los objetos (T1 y T2). Luego, se sacó a la rata de la arena y se regresó a su caja. Para evitar rastros de olor se quitó el aserrín sucio y se limpiaron los objetos con etanol al 70%.

Fase de reactivación

La fase de reactivación se realizó 24 horas después de la fase de muestra. Con el propósito de bloquear la evocación, la rata fue inyectada con muscimol 30 minutos antes de ser expuesta a los objetos. Pasados estos 30 minutos, se metió a la caja experimental con uno de los objetos presentado en la fase de adquisición (A, considerado ahora como objeto familiar) junto con un objeto novedoso (B). Inmediatamente después de la reactivación, las ratas fueron inyectadas con anisomicina con el fin de afectar la actualización de la información novedosa dentro de la ventana temporal en la que se da este proceso (se buscaba bloquear la incorporación del objeto B al trazo previamente establecido).

Fase de prueba

La fase de prueba se realizó 24 hrs después de la fase de reactivación. En esta fase, se presentó uno de los objetos familiares que se había presentado en la fase de reactivación (B) y un objeto novedoso (C). La rata se colocó en la arena durante 3 min y se midió el tiempo de exploración de cada objeto (tiempo de B y tiempo de C). Se realizó un contrabalanceo de localización de los objetos para evitar un sesgo por preferencia de lugar.

En la siguiente figura se muestra el protocolo de actualización utilizado en el experimento (figura 12).

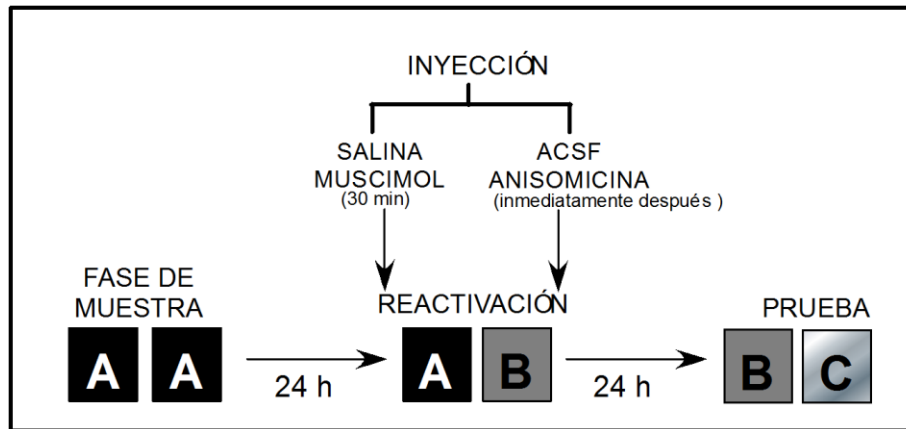


Figura 12. Las fases de muestra y de reactivación tuvieron una duración de 3 minutos mientras que la fase de prueba duró 5 minutos. Las inyecciones de muscimol en la corteza perirrinal se realizaron 30 minutos antes de la fase de reactivación y las de anisomicina inmediatamente después.

Análisis estadístico

Los videos obtenidos de las fases de muestra, reactivación y prueba fueron analizados en la computadora cronometrando el tiempo de exploración a cada objeto. Se tomó en cuenta como exploración cuando la rata tenía la nariz y los ojos frente al objeto y se requirió como tiempo de exploración total mínima 10 segundos contando ambos objetos. Con los tiempos de exploración se realizó una base de datos en la que se obtuvo para cada rata, el tiempo de exploración en todas las fases (muestra, reactivación y prueba) de cada objeto, así como la suma de la exploración de ambos objetos, es decir, el tiempo de exploración total. Con estos datos se calculó el índice de reconocimiento (IR tiempo de exploración por objeto/tiempo de exploración total) para cada grupo experimental (SAL/ACSF, SAL/ANI, MUSC/ACSF, MUSC/ANI). Para determinar si las ratas eran capaces de discriminar los objetos novedosos de los familiares, se utilizó la prueba t de Student de un grupo de una cola, con la finalidad de comparar los IR de cada

grupo con una media hipotética (0.5) que indicaba la ausencia de una diferencia significativa en la exploración de ambos objetos. Las gráficas se obtuvieron comparando el IR de cada grupo con la media hipotética y separando los datos para la exploración de cada objeto.

Se realizó el análisis únicamente con el primer minuto de exploración, ya que se ha observado que es durante este tiempo cuando las ratas exploran más (Dix & Aggleton, 1999).

RESULTADOS

Para el desarrollo de la investigación se dividió a los grupos primero, en la fase de muestra, en las condiciones de exploración de los objetos novedosos. En la fase de reactivación, se dividió a los sujetos en 2 condiciones experimentales, los grupos inyectados con solución salina (n=19) y, los sujetos inyectados con muscimol (n=15).

Para la fase de prueba, se dividieron a los sujetos en 4 grupos, el grupo que recibió la inyección de salina y ACSF (n=12), el grupo inyectado con salina y anisomicina (n=6) y, los grupos inyectados con muscimol y ACSF (n=7) o muscimol y anisomicina (n=8).

En la fase de muestra, el tiempo de exploración para cada objeto fue el mismo, ya que el análisis estadístico de los resultados indicó que no había una diferencia significativa entre la exploración de un objeto en comparación con el otro ($t=0.751$, $P=0.4580$, grados de libertad (gl)=33; ver figura 13).

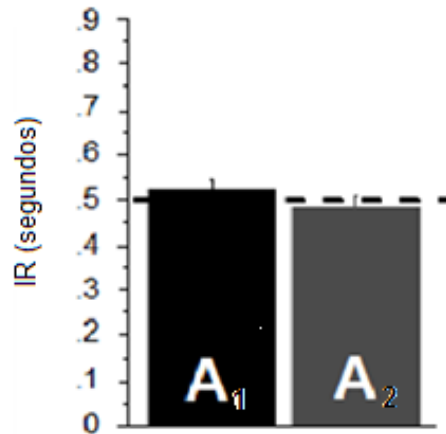


Figura 13. Fase de Muestra. La gráfica muestra el índice de reconocimiento (IR) que tuvieron los animales para cada objeto. El porcentaje de exploración no arrojó diferencias significativas con la media hipotética de 0.5 (valor de $t=.751$; $P>0.05$; $gl=33$, $n=34$).

En la fase de reactivación el grupo con salina mostró una diferencia entre el índice de reconocimiento para el objeto familiar (A), en comparación con el objeto novedoso (B), alcanzando una diferencia estadísticamente significativa en comparación con la media hipotética de 0.5 ($t= 4.737$, $P=0.0002$, $gl=18$; ver figura 14). Por otro lado, el grupo con inyecciones de muscimol no mostró esta diferencia entre los índices de reconocimiento tanto del objeto A como del objeto B ($t= 1.476$, $P=0.1622$, $gl=14$). Esto indica que el animal no fue capaz de evocar la memoria del objeto previamente consolidado (figura 14).

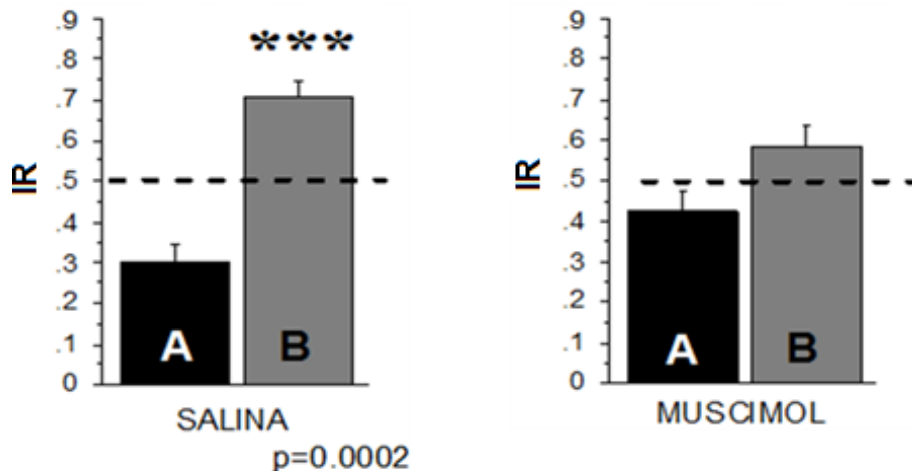


Figura 14. Fase de Reactivación. El grupo de salina muestra en la gráfica que hay diferencias significativas en los tiempos de exploración para el objeto A (familiar) en comparación con el objeto B (novedoso), mientras que el grupo de muscimol muestra en la gráfica que no hay diferencias estadísticamente significativas en el índice de reconocimiento del objeto A en comparación con el objeto B. Grupo de Salina valor de $t= 4.737$; $P<.05$; $gl=18$, $n=19$. Grupo de muscimol valor de $t= 1.476$, $P=0.1622$; $gl=14$, $n=15$.

En la fase de prueba hubo cuatro grupos. El grupo de salina/ACSF (figura 15.A) mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el índice de reconocimiento del objeto familiar (B) y el objeto novedoso (C) ($t= 4.505$, $P<.05$, $gl=11$, $n=12$). Para el grupo de salina/anisomicina (figura 15.B) se observó que no hubo una diferencia significativa entre el índice de reconocimiento de los objetos B y C ($t=0.338$, $P=0.7491$, $gl=5$, $n=6$).

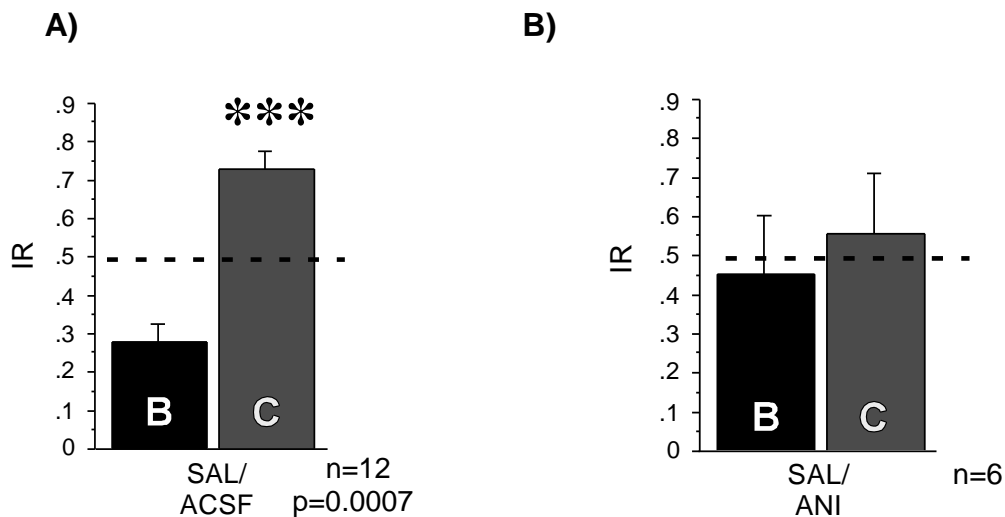


Figura 15. Fase de Prueba. La grafica A fue el grupo vehículo SAL/ACSF, en el cual se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el índice de reconocimiento del objeto B (objeto familiar) en comparación con el objeto C (objeto novedoso) Valor de $t=4.505$; $P<.05$; $gl=11$, $n=12$. En la gráfica B se muestra el grupo de SAL/ANI, en donde no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la exploración del objeto B en comparación con el objeto C. $t=.338$; $P=.7491$; $gl=5$, $n=6$.

En el grupo de muscimol/ACSF (figura 16.A), se muestra una diferencia estadísticamente significativa en el índice de reconocimiento del objeto B en comparación con el objeto C ($t= 3.505$, $P<.05$, $gl=6$, $n=7$).

En la figura 16.B se observa en el grupo de muscimol/anisomicina que no hubo una diferencia significativa entre el índice de reconocimiento del objeto B en comparación con el objeto C ($t= 0.849$, $P=0.4239$, $gl=7$, $n=8$).

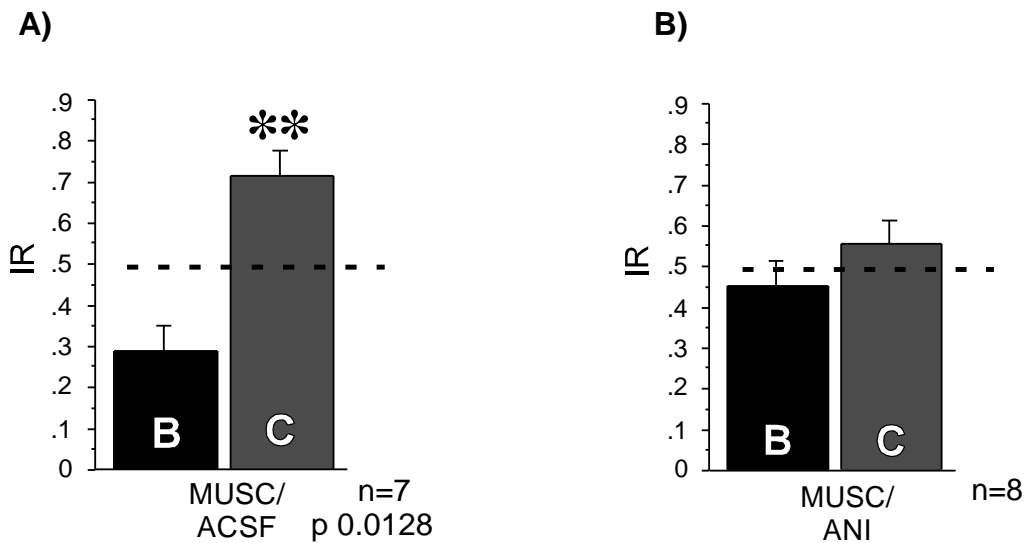


Figura 16. Fase de Prueba. En la grafica A, el grupo de MUSC/ACSF muestra una diferencia estadísticamente significativa en el índice de exploración del objeto B en comparación con el objeto C. $t= 3.505$; $P<.05$; $gl=6$, $n=7$. La gráfica B, en el grupo de MUSC/ANI se observa que no hay diferencias significativas en el índice de reconocimiento del objeto B en comparación con el objeto C $t= .849$; $P=.4239$; $gl=7$, $n=8$.

DISCUSIÓN

El grupo salina/ACSF muestra en la figura 15.A que tanto en la fase de reactivación como en la de prueba, los animales fueron capaces de consolidar y actualizar respectivamente la información novedosa entrante. Para el grupo de salina/anisomicina se observa en la figura 15.B que a pesar de que las ratas sí fueron capaces de evocar la memoria del objeto previamente presentado, la reactivación de la memoria desestabilizó el trazo volviéndolo susceptible a su bloqueo mediante la inyección de anisomicina.

En el grupo muscimol/ACSF se muestra que aunque los animales no fueron capaces de evocar la memoria del objeto familiar el día de la fase de reactivación, la memoria sí fue desestabilizada y, por lo tanto, los animales sí pudieron

incorporar la información del objeto B y de esta forma actualizar el trazo previo, mostrando preferencia por el objeto novedoso del día de la prueba (objeto C) (figura 16, gráfica A).

En la figura 16.B se observa que el grupo de muscimol/anisomicina no fue capaz de reconocer al objeto B como familiar, explorándolo el mismo tiempo que el objeto novedoso (objeto C).

Estos resultados indican que a pesar de que el muscimol bloqueó la evocación de la memoria, el trazo sí fue reactivado, ya que la inyección de anisomicina bloqueó la consolidación del objeto B como familiar, por lo que las ratas no fueron capaces de reconocerlo.

Tanto el grupo de MUSC/ACSF como el de MUSC/ANI confirman la hipótesis planteada, ya que los resultados muestran cómo la información es reactivada aunque ésta no se evoque. Este proceso de reactivación puede comprobarse con la actualización del trazo de memoria al incorporarse nueva información (en este caso el objeto B es la información novedosa). La anisomicina, por otro lado, fue capaz de bloquear dicha incorporación de la información gracias a la reactivación del trazo, ya que de no haberse reactivado, la anisomicina no habría tenido ningún efecto.

Por un lado, estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Rossato et al. (2007), quien observó el efecto amnésico de la anisomicina, inyectada inmediatamente después de la fase de reactivación en la tarea de MRO (Rossato et al., 2007), concluyendo que se requiere de la desestabilización del trazo previamente consolidado, lo que permite la entrada de nueva información para que el trazo pueda ser actualizado. Sin embargo, este experimento también señala que, en la fase de reactivación no es necesaria la evocación conductual explícita de esta tarea para que el trazo sea desestabilizado y la información pueda ser actualizada. Esta conclusión se obtiene a partir del grupo de MUSC/ANI ya que aun cuando las ratas no fueron capaces de evocar la tarea, la memoria sí entró en un estado lábil y la anisomicina mantuvo su efecto amnésico.

Estos resultados muestran que si se inhibe la evocación explícita de la memoria, el trazo aun puede ser desestabilizado mediante su reactivación. Estos resultados sugieren que la reactivación induce una desestabilización del trazo de memoria y por lo tanto puede ser modificado por inhibidores de la síntesis de proteínas (Ben Mamou et al., 2006).

Yasoshima y colaboradores (2005) realizaron una serie de experimentos utilizando la tarea de condicionamiento de aversión al sabor. La tarea consistía en asociar un sabor sin consecuencias gástricas para el animal (sacarina) con la inyección intraperitoneal de cloruro de litio (sustancia que provoca malestar gástrico). En subsecuentes presentaciones, el sabor asociado al cloruro de litio será evitado por el animal, disminuyendo su consumo aun presentado sin el estímulo aversivo. Una vez establecido el condicionamiento, al día siguiente se inyectó un antagonista de los receptores AMPA y CNQX en la amígdala basolateral antes de la presentación del sabor (reactivación) y al día siguiente se realizó la prueba (figura 17).

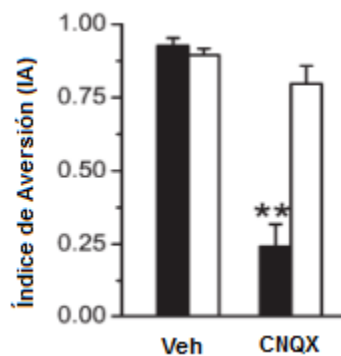


Figura 17. Modificado de Yasoshima et al., 2005. La barra negra representa el índice de aversión del día de la reactivación y la barra blanca representa el consumo el día de la prueba.

Los animales inyectados con CNQX antes de la fase de reactivación disminuyeron su índice de aversión a la sacarina, lo cual indica que el CNQX bloqueó la

evocación explícita de la memoria de aversión. Sin embargo, en la fase de prueba, los animales aumentaron su índice de aversión.

Estos resultados mostraron que los receptores AMPA en la amígdala basolateral están relacionados con la evocación de la tarea de aversión al sabor. Sin embargo, aunque la evocación de la tarea sea bloqueada, al día siguiente la memoria no está afectada (Yasoshima et al., 2005).

Los resultados de estos experimentos junto con los de Ben Mamou et al. (2006), proponen un papel diferencial para los receptores AMPA y los NMDA en la tarea de condicionamiento auditivo al miedo, así como en la de aversión al sabor. Por un lado, los receptores AMPA parecen estar relacionados con la evocación conductual del trazo de memoria previamente establecido; sin embargo, esto no indica que el trazo no haya sido reactivado, por el contrario, la memoria sí puede ser reconsolidada debido a la activación de los receptores NMDA.

En la misma línea de investigación, Lee y colaboradores realizaron en el 2008 una serie de experimentos enfocados en la descripción de los procesos de actualización y reconsolidación a nivel celular. Utilizando la tarea de condicionamiento al miedo se realizó un protocolo de consolidación y uno de reactivación con el fin de saber qué mecanismo era el que se encargaba de la actualización del trazo. Si la actualización dependía de la consolidación de un nuevo aprendizaje, entonces ratones inyectados con un antisentido (ASO) para la proteína BDNF (proteína que se ha visto implicada en la consolidación de la memoria), tendrían una disminución en el porcentaje de congelamiento en la tarea de condicionamiento al miedo. Por otro lado, si la actualización de la información dependiera de la reconsolidación, entonces ratones inyectados con un antisentido para la proteína sintetizada del gen zif-268, proteína que se ha visto implicada en la reconsolidación de la memoria tendrían un daño en la memoria, mientras que los ratones con el antisentido para BDNF no presentarían este daño (figura 18).

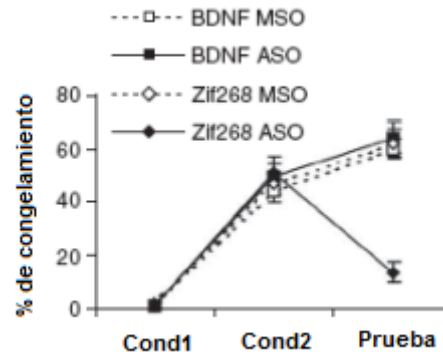


Figura 18. Protocolo de reactivación de la memoria en una tarea de condicionamiento al miedo. Los grupos se hicieron con un antisentido (ASO) para BDNF y para zif-268. El vehículo (MSO) es el grupo control (Lee, 2008).

La gráfica muestra que en la reactivación se activan mecanismos asociados a la reconsolidación de la información debido a que el grupo del antisentido a zif-268 fue el único con un daño en la memoria, presentando un bajo porcentaje de congelamiento. Sin embargo, cuando hay entrada de información novedosa en el trazo de memoria previamente consolidado (figura 19), los mecanismos que se activan son los relacionados con la consolidación de la información de la tarea previamente adquirida.

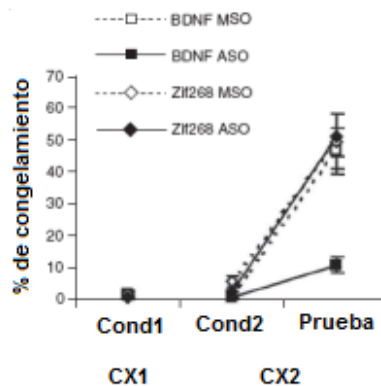


Figura 19. El protocolo de reactivación es el mismo que el de consolidación, con la diferencia de que el aprendizaje se presenta en un contexto y la reactivación y prueba, se dan en otro contexto diferente (Lee, 2008).

En el grupo del antisentido a la proteína BDNF, aunque el trazo se reactiva, la entrada de nueva información que en este caso es el contexto novedoso, hace que la información deba ser consolidada para su incorporación a la memoria original. Se puede observar que es este grupo el que presenta un daño en la memoria, mientras que el grupo del antisentido a zif-268 presenta la memoria intacta (Lee, 2008).

Estos experimentos junto con los resultados de esta tesis indican una probable participación diferencial tanto al nivel de los receptores y modificación de la expresión génica, como a nivel de la corteza, tanto para los procesos de evocación de la memoria, así como para su reactivación.

Una probable explicación sería que, así como para la memoria espacial en donde el hipocampo parece tener una red de codificación en donde el almacenamiento y la evocación puedan suceder en distintos sitios de esta corteza (hipocampo dorsal relacionado con la evocación de la información e hipocampo ventral relacionado con el almacenamiento de la misma) (Moser y Moser, 1998), para la memoria de reconocimiento de objetos, la corteza perirrinal tenga un papel tanto de recuperación de la información aprendida (evocación), así como de la reactivación de dicha información y la desestabilización del trazo de memoria, permitiéndole al sistema la incorporación de nueva información al trazo previamente consolidado.

Al bloquear con muscimol la evocación de la memoria, la corteza perirrinal podría estar reactivando la información mediante la actividad de otros receptores o por la actividad de otras subregiones dentro de esta corteza, lo cual podría estar produciendo la desestabilización del trazo. Esto provocaría que la anisomicina inyectada después de la reactivación de la tarea produjera un daño en la memoria.

Se asume que dentro de las estructuras involucradas en el almacenamiento de la información, la memoria se codifica en diferentes lugares (Bermúdez-Ratonni, 2001). Así, cuando se activan mediante el muscimol únicamente a los receptores GABAA, de la corteza perirrinal, la reactivación de la memoria podría estarse

dando en otra subregión dentro de la misma corteza o incluso en otras áreas corticales.

CONCLUSIONES

La información que ya había sido almacenada de manera permanente en la memoria puede ser reactivada mediante la incorporación de nueva información al trazo. Esto se obtiene gracias a la participación de la corteza perirrinal en la formación de la memoria de reconocimiento de objetos.

La participación de los receptores GABAA en la evocación de la memoria queda demostrada, ya que la inyección de muscimol en la corteza perirrinal impide que los animales sean capaces de evocar explícitamente la información previamente consolidada; sin embargo, esto no quiere decir que la información no pueda ser reactivada. La inyección de anisomicina posterior a la fase de evocación indica que aunque los animales no pudieron evocar la tarea, el trazo sí fue reactivado y la inhibición de la síntesis de nuevas proteínas impidió que la información se pudiera actualizar. Por otro lado, los animales inyectados con muscimol pero no con anisomicina fueron incapaces de evocar la información en la fase de reactivación, sin embargo en la fase de prueba mostraron un buen desempeño de la tarea, indicando que la información no se había perdido y que al contrario, ésta pudo ser actualizada.

Si bien estos resultados demuestran que se puede presentar la reactivación sin la evocación al inyectar muscimol en la corteza perirrinal, esto no indica en que parte del sistema se está dando la reactivación de la información, por lo que futuras investigaciones relacionadas a este tema podrían dar a conocer de manera más específica la zona del cerebro encargada de reactivar la memoria.

Por otra parte, podemos afirmar que toda información que entra en un sistema con memorias previamente almacenadas estará actualizando dicha información, lo que

significa que es muy difícil poder concebir un organismo que no tenga información previamente almacenada.

En la actualidad, la ambigüedad en el significado de los procesos de consolidación, re consolidación y actualización son considerados una limitante en esta investigación ya que esto implica que estos procesos no puedan ser categorizados más específicamente, sin embargo, al estudiar más a fondo estos procesos se podrá ser más preciso en cuanto a su funcionamiento y en cuanto a su definición.

REFERENCIAS

Abe H., Ishida Y., Iwasaki T. (2009). Functional difference between rat perirhinal cortex and hippocampus in object and place discriminations tasks. *Behavioural Brain Research*, 197: 388-397.

Albasser D., Davies M., Futter J., Aggleton J. (2009). Magnitud of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: effects of varyin the lesion extent and the duration of the sample period. *Behavioral Neuroscience*, 123: 115-124.

Baddeley, A. (1999). Memoria humana. Teoría y Práctica. Madrid, España; Trillas.

Balderas I., Rodríguez-Ortíz C., Salgado-Tonda P. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & Memory*, 15: 618-624.

Ben Mamou C., Gamache K., Nader K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature Neuroscience*, 9, 10: 1237-1239.

Bermúdez-Ratonni, F. (2001). Memoria (1ª edición). México; Trillas, 14.

Bozon B., Davis S., & Laroche S. (2003). A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Cell Press*, 40: 695-701.

Bussey T., Saksida L., Murray E. (2006). Perirhinal cortex and feature-ambiguous discriminations. *Learning & Memory*, 13: 103-105.

Corcoran K., Maren S. (2001). Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *The Journal of Neuroscience*, 21(5): 1720-1726.

Dix Sophie L., Aggleton J. P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research*, 99: 191-200.

Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram?. *Annual Review of Psychology*, 55: 51-86.

Ennaceur A. (2010) One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*, 215: 244-254.

Gluck M., Mercado E., Myers C. (2008). Aprendizaje y memoria (1ª edición). Interamericana de México, México, McGraw Hill, 1.

Han-Szu W., Morris R. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation and reconsolidation. *Annual Review of Psychology*, 61; 49-79.

Holt W., Maren S. (1999). Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *The Journal of Neuroscience*, 19(20): 9054-9062.

Jones M., Errington M., French P., Fine A., Bliss T., Garel S., Charnay P., Bozon B., Laroche S., Davis S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience*, 4: 289-296.

Kandel E. (2000). The molecular biology of memory storage: A dialog between genes and synapses. *Bioscience Report*, 21 (5): 556.

Kandel E. (2000). Principles of neural science, center for neurobiology and behavior, College of Physicians & Surgeons of Columbia University and The Howard Hughes Medical Institute (4th edition) 1027.

Lechner H., Squire L., Byrne J. (1999). 100 years of consolidation - remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*, 6: 77-87.

Lee J. (2008). Memory reconsolidation mediates the strength of memories by additional learning. *Nature*, 11, (11): 1264-1266.

Lima R., Rossato J., Furini C., Bevilaqua L., Izquierdo I., Cammarota M. (2009). Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91: 466-472.

McGaugh J., McIntyre C., Power A. (2002). Amygdala modulation of memory consolidation interaction with other brain systems. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78: 539-552.

McGaugh JL. (2000). A Century of Consolidation. *Science*, 287: 247-251.

McKenzie S., Eichenbaum H. (2011). Consolidation and reconsolidation: Two lives of memories?. *Neuron*, 71: 224-234.

Milner B., Squire L., Kandel E. (1998). Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, 20: 445-468.

Misanin J., Miller R., Lewis D. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, 130: 554-555.

Moser M., Moser E. (1998). Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 18(18): 7535-7542.

Nader K. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406: 722-726.

Nader K. (2009). A single standard for memory: The case for reconsolidation. *Nature*, 10: 224-234.

Paxinos, G. & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates (6ta edición). Londres: Academic Press, XXI.

Rodriguez-Ortiz C., De la Cruz V., Gutierrez R., Bermúdez-Rattoni F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning & Memory*, 12: 533-537.

Rosenzweig R., Leiman L. (2003). *Psicología Fisiológica* (2ª edición). México, Mc Graw Hill, 679.

Rossato J., Bevilaqua L., Medina J., Izquierdo I., Cammarota M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of Object Recognition Memory. *Learning & Memory*, 14: 36-46.

Sara S. (2006). In memory of consolidation. *Learning & Memory*, 13: 515-521.

Squire L., Stark C., Clark R. (2004) The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27: 279-306.

Staresina B., Duncan K., Davachi L. (2011). Perirhinal and parahippocampal cortices differentially contribute to later recollection of object and scene related event details. *The Journal of Neuroscience*, 31(24): 8739-8747.

Tulving E. (1991). Memory organization and locus of change. Concepts of human memory. Chapter 1, 1-32, Oxford University Press.

Wan H., Aggleton J., Brown M. (1999). Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *The Journal of Neuroscience*, 19 (3): 1142-1148.

Wang S. & Morris R. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation and reconsolidation. *Annual Review of Psychology*, 61: 49-79.

Westerberg C., Miller B., Reber P., Cohen N., Paller K., (2011). Neural correlates of contextual cueing are modulated by explicit learning. *Neuropsychologia*, 1-9.

Winters B., Bartko S., Saksida L., Bussey T. (2010). Muscimol AP5 or scopolamine infused into perirhinal cortex impairs two-choice visual discrimination learning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93: 221-228.

Yasoshima Y., Yamamoto T., Kobayashi K., (2005) Amygdala-dependent mechanisms underlying memory of conditioned taste aversion. *Chemical Senses*, 30: 158-159.