



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE PSICOLOGIA**

**EFFECTO DEL BLOQUEO DE LA EVOCACIÓN DE LA MEMORIA DE  
RECONOCIMIENTO SOBRE SU RECONSOLIDACIÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADA EN PSICOLOGIA**

**P R E S E N T A:**

**MARIANELA SANTOYO ZEDILLO**



**DIRECTORA DE TESIS: DRA. ARIANA ISRAELA BALDERAS MORENO**

**REVISORA DE TESIS: DRA. ALEJANDRA E. RUIZ CONTRERAS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México a cargo del Dr. Federico Bermúdez Rattoni. Fue dirigido por la Dra. Ariana Israela Balderas Moreno. Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 155242 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM).

A la Dra. Israela Balderas, por ser un gran ejemplo de vida, por ser mi tutora, mi amiga e inspiración.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por abrirme las puertas al laboratorio que sería mi primer gran amor en este hermoso mundo de las neurociencias, por su paciencia, gran conocimiento y calidez.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios, por la revisión de este trabajo y gran comprensión a los Doctores Antonio Zainos, Eduardo Calixto y Hugo Sánchez.

A la Dra. Alejandra Ruiz, querida maestra y revisora de este trabajo.

A la Técnica Académica Q.F.B. Perla Moreno Castilla, Oreste Carbajal, Patricia Delgado, Dr. Jean-Pascal Morin y Gabriel Orozco por la asistencia técnica, la paciencia y el apoyo recibido durante la realización de este proyecto.

# DEDICATORIA

A mis abuelos por sus sabias palabras y dulces recuerdos de la infancia guardadas como mis más agradables memorias.

A mis padres, Sofía y Guillermo, con cariño, admiración y respeto, por su apoyo incondicional, palabras de aliento, amor y ejemplo a lo largo de mi vida, ustedes son parte esencial de cada uno de los logros que he tenido durante este camino de formación académica, al principio de la mano y más tarde con sus enseñanzas y cariño auestas.

A mis hermanos, Guillermo y César, por ser una parte importante de mi vida, inspirándome siempre a crecer.

A toda mi familia, de un lado y del otro, pero siempre tan cerca de mi corazón y mi mente.

A Alejandro, por ir a mi lado en esta etapa de la Universidad, por ser mi amigo, mi cómplice, mi unidad y mi gran amor.

A mis amigos incondicionales casi hermanos y de toda una vida: Rodrigo Z., Belén, Alexander, Raúl, Gonzalo, Víctor e Ilse.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi *alma mater* y una institución que viste de orgullo y tradición.

A mi Facultad por permitirme conocer a grandes amigos, disfrutar maravillosas cátedras de sus académicos y por permitirme ser parte de su tradición para seguir consolidando mi conocimiento del maravilloso mundo de la Psicología.

A mis compañeros del IFC, de la división de Neurociencias; Karina, Analí, Daniel Á., Daniel O. Fernando, Alejandro B., Mayra, Maya, Héctor, Manuel, y Gabriela.

A todos aquellos que aunque no menciono, guardo muy dentro de mi corazón.

A todos ustedes ¡gracias!

“-Supongo que esa muchacha no le dio solamente malos ratos-me dijo.

Los recuerdos de ella pasaron por mi mente.

-Pues, no... -respondí.

-Entonces no rompa esa fotografía, mejor guárdela y mírela de repente. Cuando una persona ha significado mucho en nuestras vidas, para bien o para mal, y se ha ido, no debemos tratar de encerrarla en el olvido, porque el olvido tiene una puerta que se abre cuando menos lo esperamos y nos lanza recuerdos como caballos salvajes que nos patean el alma. Aprenda a domar el recuerdo de esa muchacha. Los recuerdos domados no lastiman... Supongo que algo bonito, digno de recordar, le habrá dejado...

Recapacité un momento.

-Pues sí tío... -le dije, pensando en las veces que junto a ella me había sentido el hombre más feliz del mundo.”

(Donde habitan los ángeles, Claudia Celis)

I.	RESUMEN .....	1
II.	INTRODUCCIÓN	
	2.1 MEMORIA .....	2
	2.2 RECONSOLIDACIÓN .....	5
	2.3 RECONSOLIDACIÓN Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS.....	7
	2.4 MEMORIA DE RECONOCIMIENTO .....	8
	2.5 CORTEZA PERIRRINAL .....	12
	2.6 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	14
	2.7 PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES AMPA EN LA EVOCACIÓN.....	17
	2.8 PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES NMDA EN LA RECONSOLIDACIÓN .....	21
	2.9 PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS EN LA EVOCACIÓN Y RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO .....	23
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVO	
	3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
	3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	25
	3.3 JUSTIFICACIÓN .....	25
	3.4 OBJETIVO .....	26
	3.5 HIPÓTESIS .....	26
IV.	MATERIALES Y MÉTODO	
	4.1 SUJETOS.....	27
	4.2 CIRUGÍA.....	27
	4.3 MICROIFUSIÓN .....	28

4.4 HISTOLOGÍA .....	28
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
4.6 PROCEDIMIENTO DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS	
4.6.1 APARATOS EXPERIMENTALES.....	31
4.6.2 PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.....	31
4.6.3 TAREA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS.....	32
4.7 PROCEDIMIENTO ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA	
4.7.1 APARATOS EXPERIMENTALES.....	33
4.7.2 PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL.....	34
4.7.3 TAREA ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA.....	34
V. RESULTADOS	
5.1 RECONOCIMIENTO DE OBJETOS.....	36
5.2 ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA.....	39
VI. DISCUSIÓN .....	42
6.1 BLOQUEO DE RECEPTORES AMPA Y SU IMPLICACIÓN EN LA EVOCACIÓN.....	43
6.2 FUNCIÓN DE LA EVOCACIÓN EN LA RECONSOLIDACIÓN.....	45
6.3 REACTIVACIÓN DEL TRAZO DE LA INFORMACIÓN ALMACENADA EN LA MEMORIA .....	47
6.4 IMPLICACIONES CLÍNICAS.....	49
VII. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS .....	
50	
VIII. CONCLUSIONES.....	51
XI. REFERENCIAS.....	52

## I RESUMEN

El aprendizaje es el proceso por medio del cual adquirimos nueva información. Al proceso por el cual este aprendizaje es almacenado y recuperado se le denomina memoria. La consolidación se refiere al proceso de almacenamiento de la memoria a largo plazo. La evocación es la expresión de la conducta por la experiencia e involucra la recuperación de la información almacenada. La reconsolidación es el proceso en el cual las memorias regresan a un estado vulnerable similar a las recién adquiridas y requieren nuevamente de consolidación después de su reactivación para conservar los cambios, ya sea modificarlos, fortalecerlos o debilitarlos.

Últimamente, diversos estudios sugieren que la evocación no es necesaria para poder activar un trazo de memoria previamente consolidado y mediante la reconsolidación, llevar a cabo la actualización y que ésta persista. Sin embargo, estos estudios han sido realizados con paradigmas aversivos como condicionamiento al miedo o condicionamiento aversivo al sabor y realizando manipulaciones farmacológicas en la amígdala.

Para probar la hipótesis de que la evocación dependiente de la corteza perirrinal no es necesaria para la reconsolidación de la memoria del tipo declarativo, en este trabajo se utilizaron dos modelos experimentales en ratas; reconocimiento de objetos y la atenuación de la neofobia para evaluar la disociación entre la reactivación de la memoria y su expresión conductual con una inactivación farmacológica transitoria de la evocación de la memoria de reconocimiento, mediante la aplicación de CNQX (antagonista de receptores AMPA) en corteza perirrinal. Por otro lado, mediante la aplicación de APV (antagonista de receptores NMDA) se bloqueó la reconsolidación para demostrar que la memoria pasó a un estado activo.

APV bloqueó la reconsolidación en ausencia de la evocación, lo que sugiere que la memoria fue activada. Por otro lado, el bloqueo de la evocación no tuvo consecuencias en su reconsolidación. Estos resultados sugieren una disociación molecular entre la evocación y la reconsolidación dependientes de la corteza perirrinal; y que la evocación no es necesaria para que se inicie el proceso de reconsolidación en el modelo de memoria declarativa de reconocimiento de objetos y atenuación de la neofobia.

## II INTRODUCCIÓN

### 2.1 MEMORIA

El aprendizaje y la memoria son mecanismos por medio de los cuales el ambiente modifica la conducta. Somos quienes somos en gran medida por lo que aprendemos y recordamos.

Los procesos de memoria y aprendizaje son importantes para muchos de los repertorios conductuales de los animales como la búsqueda e ingesta de comida, la conducta parental, el regreso al nido o la huida a un lugar seguro. Las especies tienen la capacidad de aprender, recordar, reconocer estímulos que han experimentado antes, realizar asociaciones entre ellos e incluso orientarse de acuerdo con las relaciones que establece entre sí.

El aprendizaje es el proceso por medio del cual adquirimos conocimiento acerca del mundo y moldea nuestra conducta. La memoria se define como el proceso por el cual el conocimiento es codificado, almacenado y evocado (Kandel *et al.*, 2000). A su vez, se ha categorizado en subprocesos o fases como la adquisición, la consolidación y la evocación (Dudai, 2002).

La adquisición es la estrategia cognoscitiva que usa un organismo ante la información que llega a su cerebro y puede implicar el análisis, la síntesis, la categorización y la relación con la información previa (Wagner *et al.*, 1998); es así como la nueva información es transformada en un trazo de memoria mediante la codificación de la información química, electromagnética o mecánica por los órganos sensoriales (Dudai, 2002); sin embargo, es frágil y requiere de la consolidación, que es la estabilización progresiva del trazo de memoria posterior a la adquisición y a la retención de la información en los diferentes sistemas de memoria (Dudai, 2004).

Comúnmente, la memoria es clasificada de acuerdo a sus características temporales dividiéndola en corto y largo plazo (Squire *et al.*, 1996). Se ha descrito que la memoria a corto plazo, requiere cambios en la eficacia sináptica mediante la modificación de las proteínas existentes, a diferencia de la memoria a largo plazo, la cual desencadena una serie de eventos moleculares como la activación de reguladores transcripcionales, a través de cascadas de segundo mensajeros, diferentes periodos de expresión de ARNm y síntesis de proteínas que conllevan a cambios en la función y estructura de neuronas y sinapsis (Lechner *et al.*, 1999) para estabilizar los cambios recientes (Bermudez-Rattoni, 2004).

Finalmente, la evocación se refiere a los mecanismos y estrategias de recuperación de la información que se encuentra en los sistemas de almacenamiento cerebrales para responder al medio (Dudai, 2004).

La capacidad de formar nuevas memorias nos permite adquirir experiencia de las asociaciones que obtenemos del medio ambiente. Por otro lado, también somos capaces de desestabilizar la memoria previamente consolidada, modificarla y volverla estable mediante la reconsolidación, definida como el proceso de desestabilización y estabilización sobre la memoria recién reactivada (Nader *et al.*, 2000, Dudai, 2004).

La memoria debe ser un proceso dinámico que permita actualización de la información para modificarse, lo que permite una óptima adaptación de los organismos a los cambios ambientales, de lo contrario pondrían en riesgo su supervivencia (Kandel, 2001; Squire *et al.*, 2004). Es así, como una memoria previamente consolidada vuelve de manera transitoria a una condición lábil susceptible de modificarse (Nader *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la memoria se actualiza cuando se presenta información relevante (Sara, 2000; Duvarci *et*

*al.*, 2004; Rodriguez-Ortiz *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008;), lo que sugiere que la consolidación no es un proceso estático (Dudai, 2004; Nader *et al.*, 2010) y que requiere una estabilización postreactivación denominada reconsolidación, que es también entendida como un mecanismo molecular de modificación de la información previamente consolidada y que comparte similitudes con el proceso de consolidación Nader *et al.*, 2010).

En conclusión, tanto el aprendizaje como la memoria, mantienen una relación estrecha que es indispensable en la vida. Especialmente el proceso de memoria nos da la capacidad de formar nuevas memorias nos permite adquirir experiencia y, por otro lado, también somos capaces de actualizar la memoria previamente formada, lo cual nos permite adaptarnos continuamente a los cambios en el ambiente (Bailey *et al.*, 2013).

## 2.2 RECONSOLIDACIÓN

Por definición, la consolidación se refiere al mecanismo de estabilización progresiva de una memoria recientemente adquirida para que pueda permanecer a lo largo del tiempo (Dudai, 2004). Fue propuesta inicialmente en 1900 por Müller y su discípulo Pilzecker, (Müller y Pilzecker, 1900; citados por McGaugh, 2000 y Wang *et al.*, 2006) y reportaron que la formación de una memoria estable podía ser interrumpida por un estímulo poco después del primer aprendizaje. En el año 2000, un siglo después de esta publicación, un grupo de colaboradores encabezados por Nader retomaron el concepto original de consolidación de la memoria (Nader *et al.*, 2000 citado por Prado *et al.*, 2012) al proponer que la estabilización no era permanente y que las memorias podían volver a un estado lábil susceptible de modificación. Esto fue demostrado con un experimento de condicionamiento al miedo en el cual asociaron un tono (estímulo condicionado) con un shock en la pata (estímulo incondicionado) y cuantificaron la conducta de congelamiento como índice de aprendizaje en pruebas posteriores. Veinticuatro horas después, se presentó el tono (estímulo condicionado) en ausencia del shock e inmediatamente realizaron microinfusiones de anisomicina (inhibidor de síntesis de proteínas). Veinticuatro horas después realizaron una prueba de memoria presentando el tono (estímulo condicionado) y se observó un déficit en la memoria (Nader *et al.*, 2000). Sin embargo, la microinfusión de anisomicina sin la presentación del tono (estímulo condicionado), dejaba la memoria intacta. En conclusión demostraron que la memoria previamente consolidada de condicionamiento al tono, cuando era reactivada, regresaba a un estado lábil que requería síntesis de proteínas para poder consolidar nuevamente, es decir, reconsolidar (Nader *et al.*, 2000, Duvarci *et al.*, 2008). En este reporte, Nader retomó el modelo original propuesto por Lewis de diferentes estados de

la memoria que considera que la memoria está en un estado inactivo cuando no cambia producto de la administración de diversos agentes amnésicos o moduladores (Sara, 2000); mientras que la memoria está en un estado activo cuando es susceptible de ser modificado por agentes amnésicos o fortalecido por moduladores (Lewis, 1973), después de lo cual, necesita nuevamente ser estabilizado, proceso denominado por Przybyslawski y Sara en 1997 como reconsolidación (citados por Sara, 2000). Actualmente, existe evidencia experimental que sostiene el hecho de que la memoria no es estable y ha sido demostrado que las manipulaciones que causan pérdida de la memoria después del aprendizaje inicial, también pueden conllevar a pérdida de memoria después de la reactivación o evocación (Nader *et al.*, 2000, Sara, 2000, Dudai, 2004, Duvarci *et al.*, 2008 ). Si se llevan a cabo diversos mecanismos como presentación de claves visuales o algún estímulo asociado, la memoria puede ser reactivada con dos grandes posibilidades, reorganizarse para incorporar un nuevo aprendizaje y actualizar la memoria o debilitarse hasta olvidarse (McKenzie *et al.*, 2013).

## 2.3 RECONSOLIDACIÓN Y SUS IMPLICACIONES CLÍNICAS

Durante mucho tiempo, los investigadores se han enfocado en la manera en la que consolidamos la memoria con interés en el entendimiento de enfermedades que conllevan a deterioro y pérdida de ésta. Recientemente se le ha dado importancia a la reconsolidación, actualización, fortalecimiento o debilitamiento de ciertas memorias y se ha propuesto que el propósito principal de la reconsolidación es la actualización de la memoria (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2005; Wichert *et al.*, 2013). Sin embargo, es preciso decir que el papel que juega el olvido es también importante, ya que asegura mantener al sistema en un estado óptimo (Hardt *et al.*, 2013) y que los recuerdos evolucionen a lo largo del tiempo. Poco se sabe acerca del papel activo que tiene el olvido que es también importante (Hardt *et al.*, 2013), ya que no todos los recuerdos son adaptativos o deseados y muchas veces interfieren con la vida de personas con diversos trastornos psiquiátricos como el trastorno de ansiedad generalizado, las fobias, el trastorno por estrés postraumático, las adicciones, el trastorno obsesivo compulsivo, hipermnesias, entre otras (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012). La reactivación de la memoria es una oportunidad de modificar, mejorar o incluso borrar memorias, haciendo que la manipulación de la reconsolidación sea una herramienta terapéutica prometedora y posible para ayudar a alterar memorias no deseadas en dichos trastornos psiquiátricos (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012; Wichert *et al.*, 2013).

## 2.4 MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

Para que se formen memorias de largo plazo es necesario que la información nueva se almacene a través de cambios en las conexiones entre las neuronas y las redes que forman (Kandel *et al.*, 2000). Se han descrito diversos sistemas de almacenamiento de información. Una de las principales clasificaciones distingue entre memoria explícita e implícita (Squire *et al.*, 1993 citado en Milner *et al.*, 1998; ver figura 1).

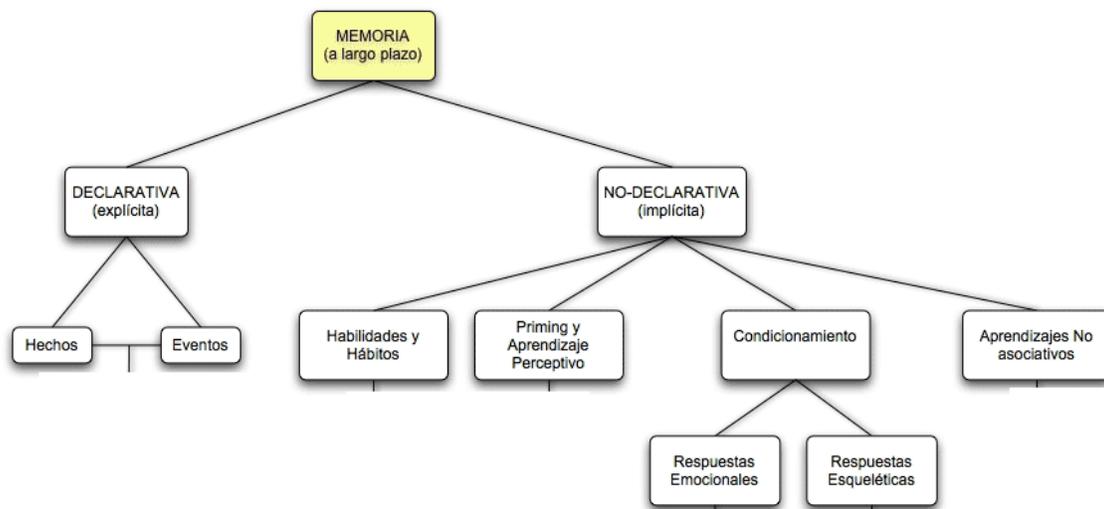


Figura 1. Clasificación de la memoria explícita e implícita. La primera se refiere a la capacidad de almacenar hechos, eventos e información autobiográfica, que se puede recuperar por objetivo y se puede declarar de alguna manera, por lo que es también conocida como declarativa, mientras que la segunda se refiere a las habilidades motoras, perceptivas y hábitos, no se puede declarar y se recupera sin intervención de un objetivo, también conocida como no declarativa (Squire, *et al.*, 1996 y Milner et al, 1998 modificado de Kandel *et al.*, 2000).

La memoria explícita está involucrada en el modelaje del mundo externo, y a su vez se divide en episódica (memoria de eventos personales) y semántica (memoria de información general) (Squire y Zola, 1996)

La memoria episódica puede ser evaluada mediante la memoria de reconocimiento y una de las principales características de síndromes amnésicos relacionados a lesiones o enfermedades neurodegenerativas es la pérdida de ésta (Brown *et al.*, 2001). La memoria de reconocimiento ha sido descrita como la habilidad de establecer que algo ha sido previamente experimentado (Brown *et al.*, 2001) Se han descrito al menos dos elementos disociables para la memoria de reconocimiento: la recolección y la familiaridad La primera hace referencia al reconocimiento de un objeto, persona o situación y declarar con exactitud la situación y la segunda es el reconocimiento de un estímulo como experimentado pero sin especificar y muchas veces se determina como el acto de recordar, pero permite determinar cualidades a los estímulos, por ejemplo aversivos o seguros (Bermudez-Rattoni, 2004), y nos permite responder apropiadamente a situaciones que hemos experimentado anteriormente (Bear *et al.*, 2007).

Un acontecimiento importante en los estudios sobre la memoria fue el caso del paciente H.M. a quien, debido a las fuertes crisis de epilepsia y la resistencia a altas dosis de medicamentos, se le realizó una cirugía experimental para remover el tejido asociado al foco epileptogéno y así poner fin a las crisis. El cirujano William Beecher Scoville removió tejido del lóbulo temporal medial de manera bilateral; y a pesar de que la cirugía fue un éxito respecto a las crisis convulsivas, el paciente sufrió una amnesia profunda posterior a la intervención quirúrgica y en particular, se vio afectada la memoria de reconocimiento (citado por Clark *et al.*, 2010). La evaluación sistemática de H.M. y otros pacientes con daño similar, es decir, con síndromes amnésicos debidos a lesiones o cirugías en el lóbulo temporal medial, estableció varios principios, entre los cuales se afirma que el procesamiento de la memoria, específicamente para la formación de memorias a largo

plazo que sean explícitas, depende de un gran número de áreas cerebrales, especialmente del lóbulo temporal medial que abarca al hipocampo, el giro parahipocampal, la amígdala entre otras (Milner *et al.*, 1998); sin embargo, estas regiones no son el depósito final de la memoria de largo plazo, ya que la memoria explícita remota de H.M. permaneció en gran parte intacta (Clark *et al.*, 2010).

Tan pronto como el caso del paciente H.M. fue descrito en 1957 por Scoville y Brenda Milner (Scoville, *et al.*, 1957; Squire *et al.*, 2009), comenzaron los esfuerzos para establecer un modelo animal con esta condición amnésica para evaluar la memoria de reconocimiento en ratas y monos (Milner *et al.*, 1998, Clark *et al.*, 2010). Uno de esos esfuerzos culminó con una prueba que explota la tendencia de los roedores a explorar por más tiempo un objeto novedoso que uno reconocido como familiar y que tiene la ventaja de ser una respuesta natural (Ennaceur *et al.*, 1988; Akkerman *et al.*, 2012). Se le llamó prueba de reconocimiento de objetos y es utilizada como una prueba confiable y estandarizada para medir la memoria de reconocimiento (Clark *et al.*, 2005; ver figura 2)

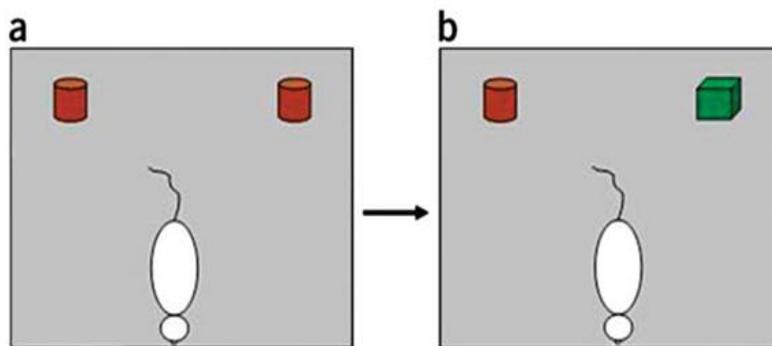


Figura 2. La prueba consiste en introducir al animal a una caja denominada arena, en donde se colocan dos objetos idénticos (a) y se les permite explorar libremente. Posteriormente se le cambia un objeto previamente presentado por uno nuevo (b) y se cuantifica el tiempo de exploración de cada objeto (Modificada de Brown, *et al.* 2012).

Otra tarea utilizada en roedores para estudiar la memoria de reconocimiento es la atenuación de la neofobia. La tarea consiste en exponer al sujeto a un sabor novedoso y se observa una disminución en el consumo comparado con ingestiones previas de agua, fenómeno denominado como neofobia. Si no hay consecuencias negativas posteriores al consumo, éste aumenta y se forma un trazo de memoria segura (Bermudez-Rattoni, 2004) y continuará el aumento de manera gradual (ver figura 3). Este tipo de aprendizaje es considerado de reconocimiento, pues los animales deben evaluar la familiaridad del estímulo e identificarlo como seguro, por lo que también es llamado memoria de reconocimiento segura del sabor (Bermudez-Rattoni, 2004).

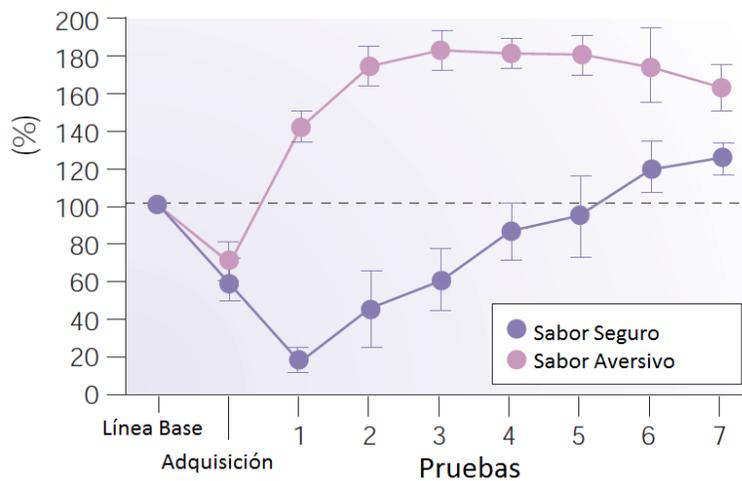


Fig. 3 Porcentaje de consumo a lo largo del experimento respecto a la línea base en un paradigma de aversión al sabor (línea morada) y de atenuación de la neofobia (línea rosa). El día de la adquisición, es decir, la presentación del sabor nuevo, se observa el fenómeno de neofobia, entendido como un decremento en el consumo respecto a la línea base. Si no hay consecuencias negativas, se observará un aumento gradual en el consumo (sabor seguro). Si el sabor se asocia con una consecuencia negativa, disminuirá más el consumo (sabor aversivo) y si en una presentación posterior no hay consecuencias aversivas, aumentará también su consumo de manera gradual (Modificado de Bermudez-Rattoni, 2004).

Dichas tareas de reconocimiento, dependen de la integridad del lóbulo temporal, importante para el procesamiento de la información de tiempo declarativo (Kandel *et al.*, 2000) ya que en él existe un grupo de estructuras interconectadas como el hipocampo, la corteza perirrinal, la corteza entorrinal y la corteza parahipocampal (Bear *et al.*, 2007; ver figura 4).

## 2.5 CORTEZA PERIRRINAL

Los estudios recientes se han enfocado en la corteza perirrinal y su papel en la memoria de reconocimiento (Winters *et al.*, 2008), la cual se ve dañada principalmente en pacientes humanos afectados por lesiones o enfermedades neurodegenerativas (Brown *et al.*, 2001)

La corteza perirrinal (ver figura 4) ha sido clasificada como una corteza de asociación polimodal, ya que recibe aferencias de todas las modalidades sensoriales, así como de áreas de asociación (Burwell *et al.*, 2001). Esta corteza envía proyecciones al hipocampo a través de la corteza entorrinal, además de estar interconectada con la amígdala y la corteza insular (Burwell *et al.*, 1995).

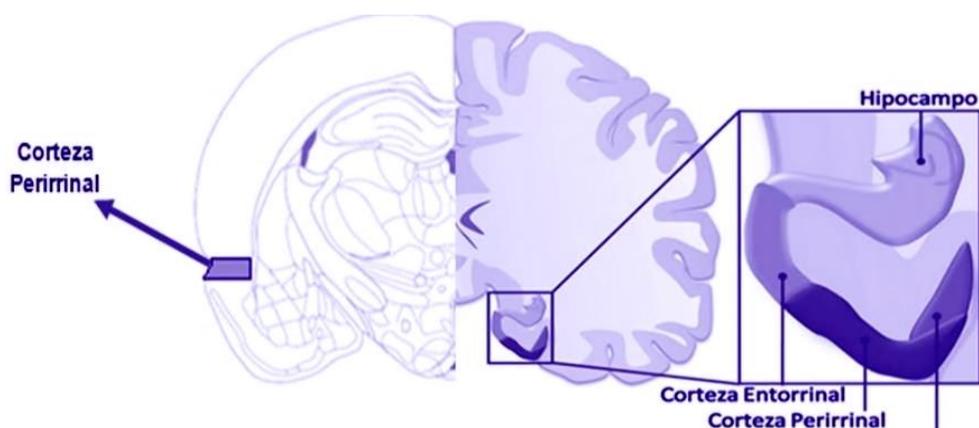


Figura 4. Del lado izquierdo se muestra un cerebro de rata y se señala la corteza perirrinal y del lado derecho se muestra en un cerebro humano la corteza perirrinal y estructuras adyacentes como corteza entorrinal, corteza parahipocampal y el hipocampo. (Modificada de Paxinos y Watson, 1997 y Bear *et al.*, 2007)

Se ha estudiado la participación de la corteza perirrinal en la memoria de reconocimiento en diversas modalidades sensoriales, tanto en la formación como en la recuperación de las asociaciones (Gutierrez *et al.*, 2004), y se sugiere que es parte de un sistema crucial para dotar a los estímulos con significado (Bartko *et al.*, 2007). En estudios electrofisiológicos

en monos, en los cuales se registraron neuronas de la corteza inferotemporal, que incluye a la corteza perirrinal, se observó que la tasa de disparo neuronal aumentó cuando se presentó un estímulo novedoso y disminuyó significativamente cuando el estímulo se volvió familiar (Miller et al., 1991; Brown *et al.*, 2002). Esta evidencia sugiere que la corteza perirrinal está relacionada con la discriminación de familiaridad y novedad en estímulos individuales (Gutierrez *et al.*, 2004).

Las lesiones en esta estructura en humanos, primates y roedores resultan en un déficit en el reconocimiento de objetos (Winters *et al.*, 2005; Broadbent *et al.* 2010; Brown *et al.*, 2012), es decir, disminuye al nivel de azar la capacidad para discriminar entre un estímulo novedoso y uno familiar (Winters *et al.*, 2008). Otros estudios en la corteza perirrinal demuestran también que estas lesiones afectan supramodalmente ya que disminuye la capacidad de reconocimiento en otras modalidades sensoriales, como la somestésica y olfativa (Brown *et al.*, 2001).

Son muchas las investigaciones que determinan la participación de receptores glutamatérgicos en la corteza perirrinal en diversas fases de la memoria de reconocimiento de objetos y sabores (Gutierrez *et al.*, 2004, Winters et al., 2005, Winters, 2008), las cuales han sido posibles gracias a aproximaciones farmacológicas con modelos animales que utilizan antagonistas o agonistas de receptores específicos para el estudio de la neuroquímica de la memoria y se enfocan en determinar el papel que juegan diversas moléculas tales como proteínas y neurotransmisores.

En el estudio de la memoria, existe un gran interés en el glutamato, principal neurotransmisor excitador en el cerebro y médula espinal (Kandel *et al.*, 2000).

## 2.6 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Se sabe que el glutamato tiene una participación importante en los estudios relacionados a la neuroquímica de la memoria (Kandel *et al.*, 2000) y su participación en procesos de plasticidad asociados a cambios fisiológicos y morfológicos que permiten que la memoria persista (Kandel *et al.*, 2000) y también en su implicación en las fases de la memoria de reconocimiento (Winters *et al.*, 2005).

Una vez liberado el glutamato de la terminal presináptica, se difunde y se une a diferentes tipos de receptores para inducir respuestas postsinápticas. Se dividen en ionotrópicos y metabotrópicos (Kandel *et al.*, 2000; ver figura 5)

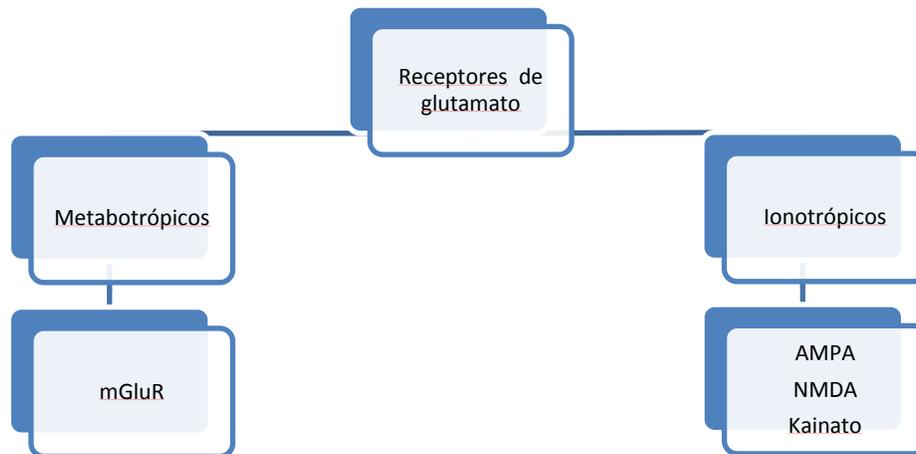


Figura 5. Clasificación de los receptores glutamatérgicos en dos grandes categorías; receptores metabotrópicos (mGluR) que están directamente acoplados a sistemas de segundos mensajeros mediados por proteínas G que indirectamente activan canales y tiene diversas clasificaciones de acuerdo a la conformación de subunidades. Los receptores ionotrópicos (iGluR) que están constituidos por canales de ligando que cuando se activan permiten el flujo de cationes a través de la membrana celular, y llevan a una despolarización de la membrana postsináptica; se pueden clasificar farmacológicamente según su activación por agonistas específicos, en tres subtipos; receptores AMPA, KAINATO y NMDA (Kandel *et al.*, 2000).

Los receptores a glutamato tipo AMPA (ver figura 6) están formados por cuatro proteínas homólogas (cualquier subunidad desde GluR1 hasta GluR4) que se ensamblan en varias combinaciones y ante interacción con el glutamato se abren rápidamente pero durante muy corto tiempo e incrementan la conductancia de diversos cationes, siendo selectivos para el sodio, potasio y pueden ser permeables al calcio (Shi *et al.*, 2001). La comunicación a través de estos receptores es crítica para la transmisión sináptica normal y está asociada con mecanismos de plasticidad sináptica y memoria (Conn, 1997). El receptor es bloqueado selectivamente con CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona).

Por otro lado, los receptores de glutamato tipo NMDA son complejos proteicos que incrementan la conductancia de diversos cationes, en especial calcio y sodio al interior de la célula y potasio al exterior (ver figura 6). Requieren, además de la unión del neurotransmisor, glicina como cofactor y que la célula esté previamente despolarizada por los receptores AMPA, ya que los bloquea un ion de magnesio. El receptor es bloqueado selectivamente con APV (ácido 2-amino-5-fosfonovalérico).

Estos receptores juegan un papel muy importante en la plasticidad sináptica tanto a corto plazo como a largo plazo (Kandel *et al.*, 2000). A corto plazo, existe una dependencia temprana de la entrada de iones de calcio, lo cual activa enzimas dependientes de calcio y ciertas cinasas en la célula postsináptica que pueden fosforilar subunidades de receptores AMPA aumentando su conductancia, así como favorecer el tráfico promoviendo su inserción en la membrana (Kandel *et al.*, 2000).

La función de los receptores NMDA a largo plazo es la dependencia de ciertos niveles de calcio intracelular y fosforilación de factores de transcripción como CREB, que propicia la síntesis de ARN mensajero para producir proteínas asociadas a la plasticidad, así como nuevos receptores que se inserten a la membrana, por lo que su bloqueo provoca déficit en la memoria de largo plazo (Kandel *et al.*, 2000).

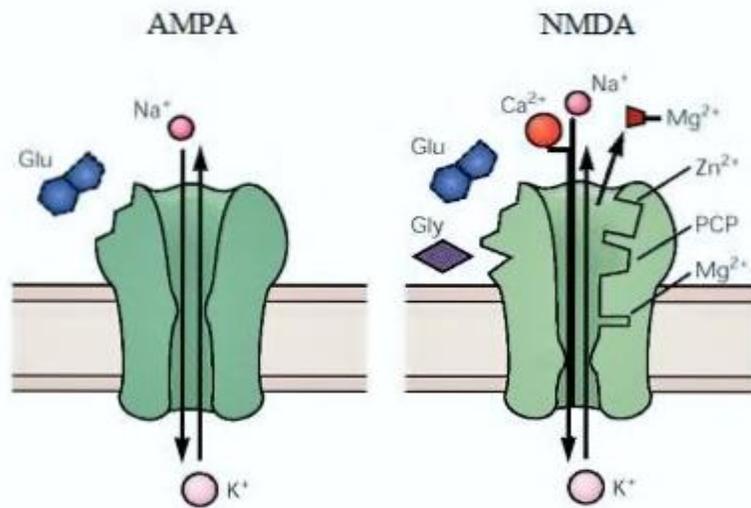


Figura 6. Receptor AMPA (izquierda) y receptor NMDA (derecha). El receptor AMPA regula un canal permeable a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. El receptor NMDA regula un canal permeable al Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>, además, tiene sitios de unión para Glicina (Gly), Zinc (Zn<sup>+2</sup>), feniclidina (PCP) y Magnesio (Mg<sup>+2</sup>), que regulan la función del canal (Kandel *et al.*, 2000).

## 2.7 PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES AMPA EN LA EVOCACIÓN

El bloqueo de los receptores AMPA o NMDA no tiene efecto en la adquisición de la memoria de sabores. En un estudio realizado por Gutiérrez y colaboradores en nuestro laboratorio (2004), a través de un paradigma de atenuación de la neofobia en ratas, inyectaron NBQX y APV, antagonistas de receptores glutamatérgicos, en la corteza perirrinal antes de la primera presentación de sacarina y no encontraron diferencias en el consumo respecto a el grupo control; esto sugiere que los receptores a glutamato, tanto NMDA como AMPA, no tienen participación en la adquisición de la información del trazo de memoria segura. Sin embargo, se ha sugerido que tienen una participación en la evocación o en la consolidación al ser parte de un sistema importante para el reconocimiento (Gutierrez *et al.*, 2004).

Esto es consistente con otro experimento realizado en nuestro laboratorio, con el protocolo de condicionamiento aversivo al sabor, después de la quinta presentación de sacarina pareada con el malestar gástrico inducido por una inyección de cloruro de litio, se inyectó NBQX en la amígdala y se observó un bloqueo en la evocación reflejada como un déficit en el reconocimiento del sabor como aversivo y cuantificado como un aumento en el consumo de sacarina (ver figura 7). Por lo que se demuestra que el bloqueo farmacológico de los receptores tipo AMPA tiene como consecuencia un déficit en el reconocimiento de sabores. Este caso es específico de la memoria de sabor y se observó que no tiene consecuencias en la reconsolidación del trazo de memoria aversiva, ya que en la sexta presentación de sacarina, los animales reconocen nuevamente el sabor como aversivo (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012).

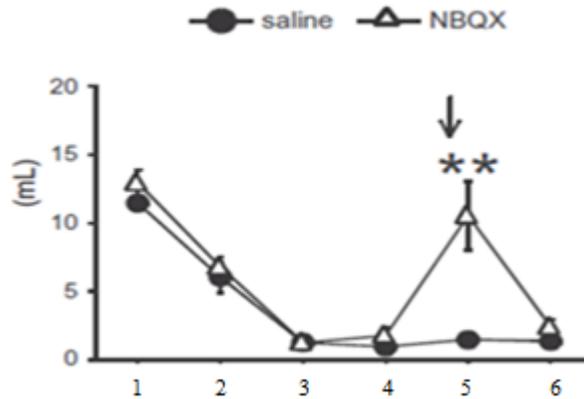


Fig. 7 En la figura se observan los mililitros de sacarina en cada presentación del sabor (eje de las abscisas) seguida por una inyección de cloruro de litio en un experimento de condicionamiento aversivo al sabor en ratas. Se observa que la infusión de NBQX en amígdala antes del quinto consumo de sacarina (indicado por la flecha), impide evocación del reconocimiento del sabor como aversivo en comparación con el grupo control, pero esto no impide la reconsolidación de la aversión al sabor en el sexto consumo de sacarina (Tomado de Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012).

El grupo de Ben Mamou utilizó la tarea de condicionamiento al miedo (Ben Mamou *et al.*, 2006, ver figura 8), en el cual parean un tono (estímulo condicionado) con un choque eléctrico en las patas de la rata, produciendo así que la presentación del tono, produzca una conducta de congelamiento (respuesta condicionada). En el experimento, reactivaron la memoria con la presentación del tono; sin embargo, por medio de la infusión del fármaco CNQX en la amígdala, impidieron la evocación de la conducta de congelamiento. En una prueba posterior, los animales mostraron reconsolidación de la memoria de miedo al tono, ya que el porcentaje de congelamiento no muestra diferencias significativas entre el grupo control, lo que implica que la evocación no es necesaria para que ocurra reactivación de la memoria. Dicha reactivación fue demostrada en la prueba posterior a la reactivación, observándose un daño en la memoria de condicionamiento al tono como efecto de la anisomicina, inhibidor de síntesis de proteínas (Ben-Mamou *et al.*, 2006).

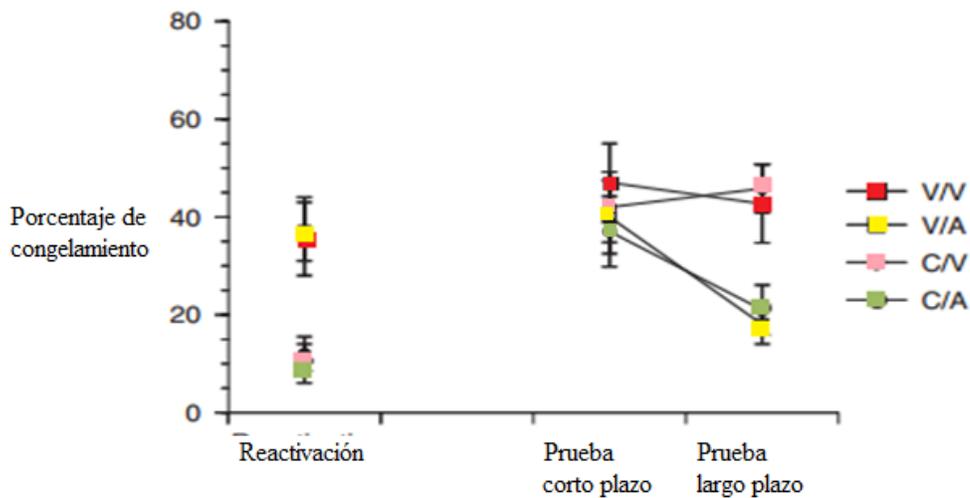


Fig. 8 En la figura se observa que el fármaco CNQX bloquea la expresión de congelamiento en la etapa de reactivación sin consecuencias en la prueba a corto y largo plazo. La inyección de anisomicina tiene como resultado un déficit en la evocación de la conducta de congelamiento sólo en la prueba de largo plazo (Ben-Mamou *et al.*, 2006).

En el 2008, Li y Burrell estudiaron el efecto del CNQX mediante electrofisiología en tejido de sanguijuelas. En el registro se observó actividad eléctrica y dividieron el experimento en dos grupos, salina y CNQX. El grupo con CNQX presentó una disminución en la actividad eléctrica, lo que significa que la sinapsis era predominantemente glutamatérgica (ver figura 8) y que el tiempo máximo de efecto ocurre a partir de los 10 minutos (Li *et al.*, 2008), por lo que aquellos tejidos bajo el efecto de CNQX presentan una disminución de la actividad mediada por los receptores AMPA. En otro estudio también realizado con tejido pero en esta ocasión hipocampo de rata, se determina que la inactivación máxima se alcanza entre los 10 a 15 minutos y que el efecto del CNQX se disipa alrededor de los 60 minutos (Day *et al.*, 2003) y se determina que el mecanismo que propicia el CNQX es la endocitosis de los receptores AMPA (Li *et al.*, 2008).

El efecto de la endocitosis del receptor AMPA fue estudiado a nivel molecular en la corteza perirrinal, en donde inyectaron un péptido de interferencia que bloquea la inducción de endocitosis de los receptores AMPA llamado TAT-GluA23Y. La tarea que utilizaron fue reconocimiento de objetos, en donde permitieron la adquisición de dos objetos idénticos y 24 horas después se inyecta el péptido y 4 minutos después se realiza la prueba de reconocimiento presentando un objeto familiar y uno novedoso (ver figura 9). Los resultados muestran que la evocación de la memoria de reconocimiento de objetos es afectada por este péptido (Cazzakoff *et al.*, 2011); sin embargo, no tiene efectos en la adquisición o en la consolidación, ya que su inyección no afecta ninguna de las dos. Esto sugiere que la inserción de receptores AMPA o su endocitosis tienen una función importante en la evocación de la discriminación de familiaridad o novedad de estímulos.

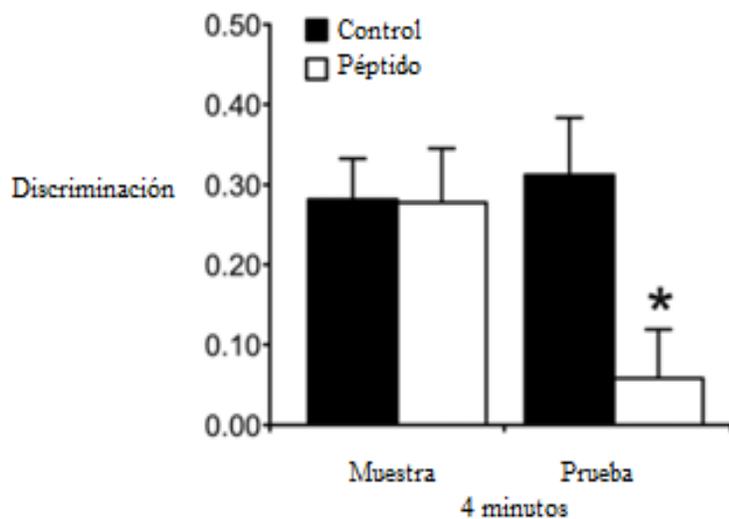


Figura 9. El bloqueo de la endocitosis de los receptores AMPA a través de la inyección del péptido TAT-Glu23Y en corteza perirrinal antes de la evocación, disminuye significativamente el reconocimiento en una prueba de discriminación entre un estímulo familiar y uno novedoso en comparación con el grupo control y se observa en la figura, del lado izquierdo que en la muestra no hay diferencias entre grupos en la discriminación de objetos, sin embargo en la prueba hay una disminución significativa en el reconocimiento del grupo inyectado con el péptido en comparación con el grupo control (Tomado de Cazzakoff *et al.*, 2011).

## 2.8 PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA EN LA RECONSOLIDACIÓN

Varios experimentos han demostrado que el bloqueo farmacológico de los receptores NMDA, después de reactivar un trazo de memoria, no afecta la ejecución de una tarea, pero sí daña las pruebas de memoria posteriores (Przybylski *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2004).

En un experimento en que pollos fueron entrenados en una tarea de evitación pasiva, y que fueron inyectados intracerebroventricular con APV (antagonista selectivo del receptor NMDA) inmediatamente después de la reactivación y mostraron un déficit en la memoria en una prueba subsecuente, pero aquellos animales que recibieron la inyección de APV, sin la reactivación de la memoria no mostraron déficits (Summers *et al.*, 1997). Lo cual sugiere que dichos receptores son indispensables para la reconsolidación, sólo cuando el trazo de memoria es reactivado (Ben-Mamou *et al.*, 2006).

El grupo de Yamamoto utilizó la tarea de condicionamiento aversivo al sabor en ratas (Yamamoto *et al.*, 2000), en el que se realiza una asociación de agua con sacarina (estímulo condicionado) con malestar gástrico inducido por una inyección de cloruro de litio (estímulo incondicionado). Ellos observaron que la infusión de CNQX en la amígdala daña la evocación de la respuesta de evitación del consumo de sacarina (Yamamoto *et al.*, 2005; ver figura 10); pero no afecta la reconsolidación de la memoria, ya que en una prueba subsecuente, evocaron la disminución del consumo de sacarina. Por otro lado, la infusión de APV en la amígdala no afectó la evocación de la disminución del consumo de sacarina, pero sí afectó la reconsolidación (Yamamoto *et al.*, 2005).

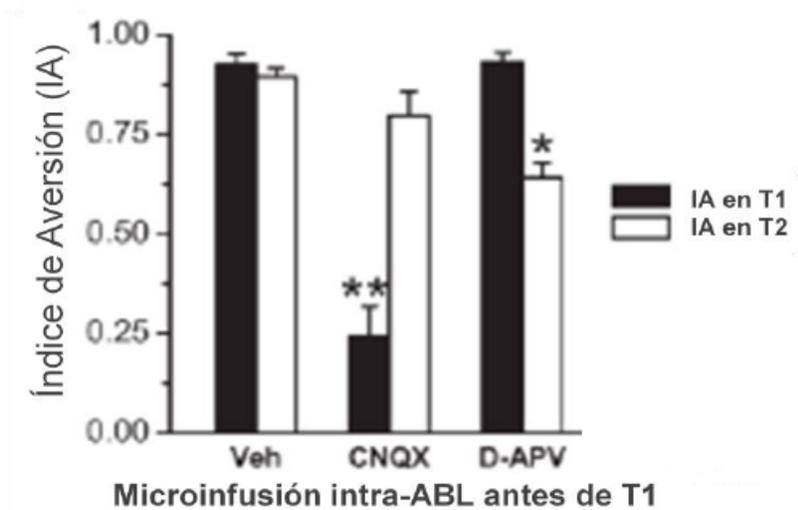


Figura 10. Índice de aversión (IA) en un protocolo de CAS en dos consumo de sacarina (T1 Y T2) de diferentes grupos de ratas con diferentes tratamientos en la amígdala basolateral antes del consumo de sacarina. El grupo control fue inyectado con vehículo (solución salina) y muestra un alto índice de aversión en el primer y segundo consumos. El grupo que tuvo inyección de CNQX mostró menos aversión en T1, sin embargo en T2, muestra un alto índice de aversión. El grupo que tuvo inyección de D-APV muestra un alto índice de aversión en T2 pero no en T1 (Yamamoto *et al.*, 2005).

Es importante señalar que el fármaco APV tiene una ventana temporal limitada, para que tenga efecto sobre la memoria de reconocimiento. Dicha ventana temporal para el efecto se obtiene sólo cuando la inyección del fármaco se realiza inmediatamente después de la conducta, pero no tiene efecto cuando es inyectado 40 minutos después (Winters *et al.*, 2005)

## 2.9 PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS EN LA EVOCACIÓN Y RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

Diversos estudios han mostrado que es posible bloquear la evocación de la memoria con la inyección de antagonistas de receptores AMPA como NBQX (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012) o CNQX (Mesches *et al.*, 1996; Winters *et al.*, 2005; Ben-Mamou *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2005) en diversas estructuras cerebrales de ratas en diversos paradigmas y que esto no afecta la reconsolidación. También se sabe que antagonizar a los receptores NMDA tiene como consecuencia un déficit en la reconsolidación y, a su vez, demuestra la reactivación del trazo de memoria. Las tareas utilizadas en los experimentos anteriores, tanto el condicionamiento de miedo al tono (Ben-Mamou *et al.*, 2006) como el condicionamiento de aversión al sabor (Yamamoto *et al.*, 2005; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012) son consideradas como aversivas y están relacionadas con la amígdala. En tareas no aversivas, el grupo de Winters (Winters *et al.*, 2008) demostró la participación de los receptores glutamatérgicos en la corteza perirrinal en la tarea de reconocimiento de objetos.

En ese estudio, se inyectaron CNQX y APV en diferentes tiempos de la tarea. Los resultados demuestran que la inyección de CNQX en la corteza perirrinal antes de la fase de prueba impidió evocación del reconocimiento de objetos, mientras que la infusión de APV en la corteza perirrinal impidió la consolidación a largo plazo, pero no la evocación o la memoria a corto plazo del reconocimiento de objetos (Winters *et al.*, 2008).

También se ha descrito la participación de la corteza perirrinal en la reconsolidación en la memoria de reconocimiento de objetos, mediante la inhibición de la síntesis de proteínas posterior a la reactivación provocando de esta manera, un daño en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, ya que los animales no muestran preferencia por el objeto novedoso en la exploración (Winters *et al.*, 2011).

En resumen, los antecedentes sugieren una función diferencial de los receptores de glutamato tipo AMPA y tipo NMDA en la evocación y en la reconsolidación probada en diversas tareas, así como participación de la corteza perirrinal en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. Sin embargo, aún no se determina si la evocación es necesaria para que exista reconsolidación ni el efecto del bloqueo de los receptores AMPA de la corteza perirrinal sobre la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos ni de sabores.

### III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVO

#### 3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evocación de la memoria ha sido sostenida como una condición indispensable para reactivar un trazo, modificarlo y reconsolidarlo. Últimamente diversos estudios sugieren que la evocación de la información previamente almacenada puede ser un proceso independiente de la reconsolidación de la memoria (Winters, 2005; Ben-Mamou, *et al.* 2006; Yasoshima *et al.* 2005 Rodriguez-Ortiz *et al.* 2012) en tareas como condicionamiento aversivo al sabor y condicionamiento de miedo al tono, por lo tanto, se estudiará el efecto del bloqueo de la evocación de la memoria de reconocimiento de objetos y sabores sobre su reconsolidación en la corteza perirrinal.

#### 3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del bloqueo de receptores AMPA de la corteza perirrinal en la evocación de la memoria de reconocimiento de objetos y sabores sobre su reconsolidación?

#### 3.3 JUSTIFICACIÓN

Los resultados de este estudio aportarán evidencia respecto a si la evocación de la información almacenada es un parámetro indispensable para que ocurra la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos o sabores.

### 3.4 OBJETIVO

Analizar la función que tiene la evocación en la reconsolidación por medio de las tareas de reconocimiento de objetos y el reconocimiento de sabores para determinar el efecto del bloqueo de los receptores AMPA en la corteza perirrinal para determinar si la evocación es necesaria para que ocurra la reconsolidación de la memoria de reconocimiento.

La variable dependiente será la conducta de reconocimiento tanto de objetos como de sabores.

Las variables independientes serán 4 grupos de trabajo; SAL-SAL como grupo control, CNQX-SAL para demostrar el efecto del bloqueo de la evocación sobre su reconsolidación y CNQX-APV y SAL-APV como grupos controles de la condición CNQX y condición APV.

### 3.5 HIPÓTESIS

Si se bloquean los receptores tipo AMPA de la corteza perirrinal, habrá un efecto de bloqueo de la evocación de la memoria de reconocimiento de objetos y sabores, sin embargo, éste no afectará su reconsolidación.

Si se bloquean los receptores tipo NMDA de la corteza perirrinal, habrá un efecto en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos y sabores sólo si ésta fue reactivada durante la evocación.

## IV MATERIALES Y MÉTODO

### 4.1 SUJETOS:

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 280-300 grs. de peso, provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico en un ambiente de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , con un ciclo luz-oscuridad 12/12, con agua y alimento *ad libitum* excepto en atenuación de la neofobia donde el consumo fue controlado. Todas las manipulaciones se hicieron en la fase de luz.

### 4.2 CIRUGÍA

Se anestesió a las ratas utilizando Ketamina (83mg/Kg), Xilacina (9mg/kg) y fueron implantadas bilateralmente cánulas 2mm encima de la corteza perirrinal (ver figura 11).

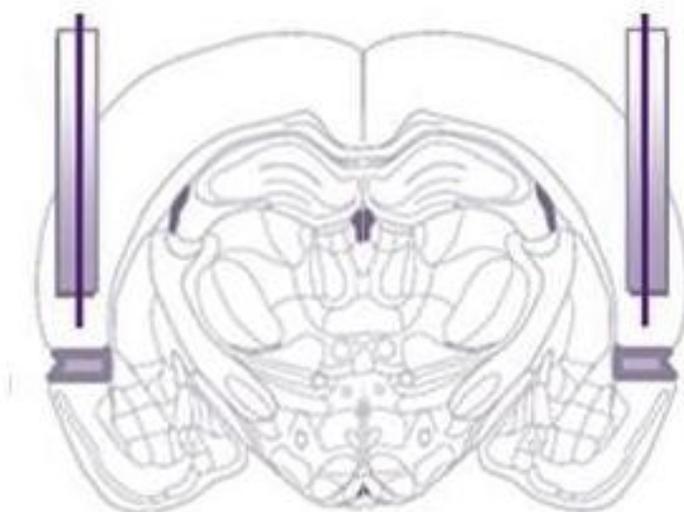


Fig. 11 Corte coronal de un cerebro de rata, se muestra el sitio de implantación bilateral de cánulas de acuerdo a las siguientes coordenadas de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (1986): anteroposterior-3 mm, lateral  $\pm 6.5$  mm y dorsoventral 5 mm. La zona sombreada representa el sitio de difusión del fármaco (dorsoventral 7mm), es decir, la corteza perirrinal.

Las cánulas fueron fijadas al cráneo con acrílico dental mediante dos tornillos colocados a 2 mm de cada cánula y se les colocó un estilete para evitar que se taparan o ensuciaran. Todos los animales tuvieron 10 días de recuperación después de la cirugía antes de cualquier procedimiento conductual.

#### 4.3 MICROINFUSIÓN

Para la microinfusión se retiraron los estiletes de las cánulas y se insertaron agujas dentales conectadas a microjeringas Hamilton de 10  $\mu$ l mediante tubería de polietileno. El sitio de infusión fue +2 mm en la coordenada dorsoventral (-7 mm). A cada rata se le inyectó 1  $\mu$ l en cada hemisferio a una tasa de 1  $\mu$ l/min y las agujas se mantuvieron un minuto más para permitir una mejor difusión del fármaco o vehículo. Los fármacos se disolvieron en solución salina 0.9% de acuerdo con las concentraciones utilizadas en estudios previos (Winters, 2005); 3mM de CNQX (SIGMA, USA) y 40 mM de APV (TOCRIS, USA). La microinfusión de la solución vehículo (salina 0.9%) se utilizó como control.

#### 4.4 HISTOLOGÍA:

Al finalizar los protocolos conductuales, las ratas recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron con una solución salina (0.9%). El cerebro se removió y se almacenó en una solución de formaldehído 4% por 24 horas.

Los cerebros se cambiaron a una solución de sacarosa 10%, 20% y 30%. Se realizaron cortes coronales de 40  $\mu$ m en la zona donde se implantaron las cánulas, se montaron en laminillas con gelatina y se dejaron secar 48 horas, antes de procesarse con la tinción de

violeta de Cresilo, después de lo cual se examinaron bajo el microscopio de luz para verificar el sitio de implantación de la cánula (figura 12).

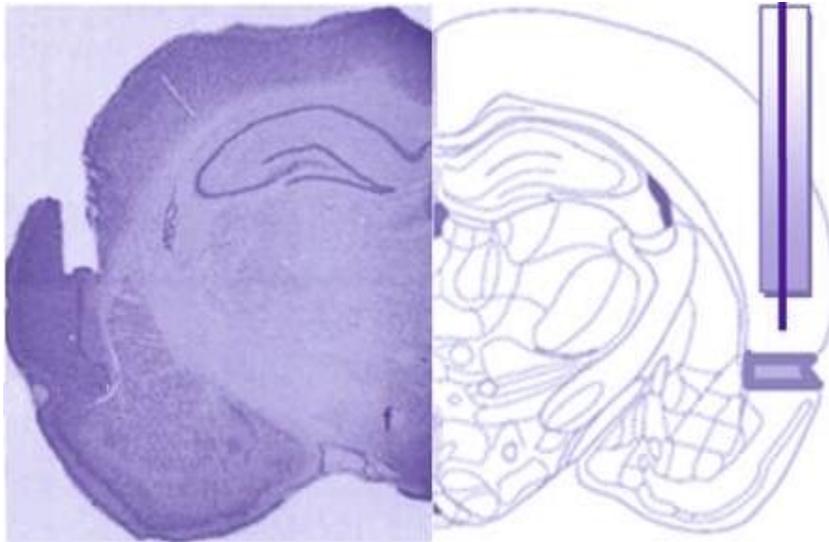


Figura 12. En la figura se observa del lado izquierdo un corte coronal de rata teñido con Violeta de Cresilo representativo de la lesión producida por la cánula y del lado izquierdo un dibujo que muestra el sitio de implantación de la cánula y el sitio de infusión.

#### 4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos están expresados como medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias estadísticas entre dos condiciones fueron determinadas mediante una prueba *t-student* no pareada y para determinar si un grupo es diferente del nivel de azar (0.5) se utilizó una prueba *t* de una muestra. Para evaluar las diferencias entre los grupos se utilizó una prueba de ANOVA de dos vías. Un valor de  $p < 0.05$ , se aceptó como estadísticamente significativo. Se utilizó un post-hoc de Bonferroni/Dunn.

En los experimentos, los grupos de trabajo y el número de ratas por grupo fueron los siguientes:

GRUPO	TIPO DE RECONOCIMIENTO	
	OBJETOS (N)	SABORES (N)
CNQX-APV	11	9
CNQX-SAL	9	8
SAL-APV	8	7
SAL-SAL	6	6
TOTAL DE RATAS	34	30

#### 4.6 PROCEDIMIENTO DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

##### 4.6.1 APARATOS EXPERIMENTALES RECONOCIMIENTO DE OBJETOS:

Se utilizaron cajas de madera (cuyas medidas fueron 40X40X60 cm), de color gris, con aserrín en el piso y colocadas en un cuarto separado del vivario. Todas las sesiones fueron videograbadas. Los objetos a reconocer fueron focos blancos (6cm de diámetro y 5 cm de largo), frascos transparentes de cristal (5.5cm de diámetro y 11cm de alto) y focos blancos en espiral (11cm de largo). Se fijaron al piso de la caja con Velcro para evitar que fueran desplazados por los animales a una distancia de 10 cm de las paredes en las esquinas traseras de la caja. En cada ensayo, los objetos fueron removidos y limpiados con alcohol para evitar pistas olfativas y el aserrín fue limpiado y cambiado.

##### 4.6.2 PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL:

Después de la cirugía a los animales se les permitió recuperarse por lo menos 10 días antes de cualquier procedimiento (ver figura 13).

Posteriormente, se llevó a los animales al cuarto experimental a las 9 am y se les dejaba dos horas antes del inicio de la sesión y 2 horas después de la sesión para evitar condiciones de estrés que afectaran la ejecución o la consolidación.

#### HABITUACIÓN

Durante 5 días consecutivos, a los animales se les manipuló durante un minuto e inmediatamente después se colocó en la arena sin objetos durante 3 minutos. Al finalizar la exploración, fueron manipulados durante otro minuto y regresados a su caja individual.



Figura 13. En la figura se representa el modelo experimental para la tarea de reconocimiento de objetos. Comienza con la cirugía para implantar cánulas guía de manera bilateral (A) y después de 10 días se habitúa a los animales (representadas como dos óvalos blancos) durante 5 días (B) en la arena experimental (representada como un cuadro). Posteriormente, comienza la fase de muestra (C) en donde se introduce al animal en la arena experimental en la cual se han colocado dos objetos idénticos y se les permite explorar por 5 minutos. 24 horas después se inyecta CNQX o vehículo (D) y después de 15 minutos se les introduce en la arena experimental en la cual están colocados un objeto nuevo y un objeto presentado en la muestra y se les permite explorar durante 5 minutos. Inmediatamente se inyecta APV o vehículo (F). Veinticuatro horas después, se les introduce en la arena, en la cual están colocados un objeto nuevo y uno idéntico al presentado en la muestra y se les permite explorar durante 5 minutos (G).

#### 4.6.3 TAREA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS:

##### FASE DE MUESTRA

Se les colocó en la arena mirando al lado opuesto donde previamente se habían colocado dos objetos idénticos (llamados A1 y A2, ver figura 13, C). Se les permitió explorar libremente durante 5 minutos. Al finalizar el tiempo, fue regresado el animal a su caja individual.

##### FASE DE EVOCACIÓN

Veinticuatro horas después de la fase de muestra, se realizó la inyección del fármaco CNQX o vehículo (ver figura 13, D) y 15 minutos después, fueron introducidos en la arena mirando al lado opuesto de donde previamente se habían colocado dos objetos, el primero

una copia idéntica del objeto previamente presentado (familiar, llamado A) y un nuevo objeto, (llamado B) (ver figura 13, E) y se les permitió explorar libremente durante 5 minutos. Al finalizar, fueron inyectados inmediatamente con el fármaco APV o vehículo (ver figura 13, F) y regresados a su caja individual.

## FASE DE PRUEBA

En la fase de prueba, 24 horas después de la fase de evocación, fueron introducidos en la arena mirando al lado opuesto de donde previamente se habían colocado dos objetos, el primero una copia idéntica del objeto previamente presentado en la fase de muestra (familiar, llamado A) y un nuevo objeto, diferente al de la fase de evocación (llamado C) (ver figura 13, G) y se les permitió explorar libremente durante 5 minutos.

## CUANTIFICACIÓN

Se cuantificó el tiempo de exploración por objeto y se consideró como conducta de exploración que los animales dirigieran la nariz en dirección al objeto a una distancia <1cm o que lo tocara con la nariz. Se calculó un índice de reconocimiento para los objetos definido como la cantidad de tiempo que pasa en un objeto, dividido entre la exploración total:

Exploración del objeto 1+ Exploración del objeto 2 = Exploración Total

Exploración del objeto 1 / Exploración total = Índice de reconocimiento 1

Exploración del objeto 2 / Exploración total = Índice de reconocimiento 2

Un índice de 0.5 expresa que no hay preferencia de un objeto sobre otro.

## 4.7 PROCEDIMIENTO DE ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA

### 4.7.1 APARATOS EXPERIMENTALES ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA

En los experimentos de atenuación de la neofobia, se utilizaron probetas graduadas a manera de bebederos para cuantificar el consumo en ml y agua obtenida del vivario y almacenada en el laboratorio.

### 4.7.2 PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL:

Después de la cirugía a los animales se les permitió recuperarse por lo menos 10 días antes de cualquier procedimiento. Se realizaron las manipulaciones en el vivario para evitar condiciones de estrés asociadas al consumo de agua.

### 4.7.3 TAREA ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA:

#### ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA BASE DE CONSUMO

Los animales fueron privados de agua durante 24 horas y durante 5 días consecutivos, se les dieron consumos controlados de 30 ml durante 15 minutos cada 12 horas. Se cuantificó el consumo y se realizó una línea base de consumo.

#### ADQUISICIÓN

El día de la adquisición, se les dio un consumo de 30 ml de una solución de sacarina (0.5%) durante 15 minutos. Una vez cuantificado el consumo se realizaron 4 grupos con igual

distribución de ratas y sin diferencias significativas entre ellas. Las ratas que no presentaron neofobia fueron descartadas. Doce horas después, se les dio un consumo de 30 ml de agua.

## EVOCACIÓN

El día de la evocación, fueron inyectadas con el fármaco CNQX o vehículo y 15 minutos después se les dio un consumo de 30 ml de una solución de sacarina (0.5%) durante 15 minutos. Al finalizar el consumo, inmediatamente se les inyectó APV o vehículo. Doce horas después, se les dio un consumo de 30 ml de agua para evitar privación prolongada de agua.

## PRUEBA

El día de la prueba, se les dieron 30 ml de una solución de sacarina (0.5%) durante 15 minutos.

## CUANTIFICACIÓN

En todas las sesiones, se midió el consumo de líquido, tanto agua como sacarina.

## V RESULTADOS

### 5.1 RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

En este experimento se evaluó mediante un protocolo de reconsolidación de la memoria para objetos si la evocación de la memoria es necesaria para que ocurra la reconsolidación en la corteza perirrinal mediante la manipulación de los receptores de glutamato tipo AMPA antes de la evocación. También se manipularon los receptores de glutamato tipo NMDA inmediatamente después de la evocación para determinar que la memoria fue reactivada, así como su participación en la reconsolidación.

En la Figura 14 (A), los animales tienen un tiempo similar en la exploración de cada uno de los dos objetos idénticos (prueba *t-student* pareada,  $p = 0.6893$ ) y tienen un índice de reconocimiento que no es diferente a 0.5 en la fase de muestra, lo que quiere decir que no muestran preferencia por algún objeto.

Los animales inyectados con solución salina 15 minutos antes de la evocación (ver figura 14, B) muestran preferencia por el objeto novedoso lo que indica que evocaron la información del objeto familiar (prueba *t-student* pareada,  $p < 0.0001$ ).

Los animales inyectados con CNQX, antagonista de los receptores tipo AMPA, 15 minutos antes del reconocimiento de objetos (ver figura 14, C), no discriminaron entre el objeto novedoso y el familiar (prueba *t-student* pareada,  $p = 0.1880$ ).

Se encontraron diferencias entre las condiciones de la inyección de salina y CNQX con una prueba ANOVA ( $F(1,35) = 32.795$ ;  $p < 0.0001$ ).

El tiempo total de exploración en la fase de evocación fue similar en ambas condiciones (CNQX y salina), sugiriendo que las diferencias no se deben a los tiempos de exploración (prueba *t-student* pareada,  $p = 0.1717$ ).

En la prueba de memoria realizado 24 horas después de la evocación, los animales del grupo que tuvo inyección de salina antes de la evocación e inmediatamente después salina (ver figura 14, D), mostraron preferencia por el objeto novedoso, lo que indica que consolidaron el objeto que fue novedoso durante la evocación y re consolidaron el objeto familiar (prueba *t-student* pareada,  $p = <0.0001$ ).

Los animales del grupo al que se le inyectó CNQX antes de la evocación y salina inmediatamente después (ver figura 14, E), también mostraron preferencia por el objeto novedoso durante la prueba, lo que indica que aunque se haya bloqueado la expresión conductual de la evocación los animales fueron capaces de consolidar la información del objeto que fue novedoso durante la evocación y re consolidar el objeto familiar (prueba *t-student* pareada,  $p <0.0001$ ).

Por otro lado, los animales del grupo al que se le inyectó salina antes de la evocación y APV inmediatamente después (ver figura 14, F), tuvieron un daño en la consolidación del objeto novedoso ya que no tuvieron preferencia por ninguno de los objetos en la prueba de memoria realizada 24 horas después de la evocación (prueba *t-student* pareada,  $p = .3986$ ).

Los animales del grupo al que se le inyectó CNQX antes de la evocación y APV inmediatamente después (ver figura 14, G), tuvieron un efecto similar al no tener preferencia por ninguno de los objetos (prueba *t-student* pareada,  $p = .1019$ ).

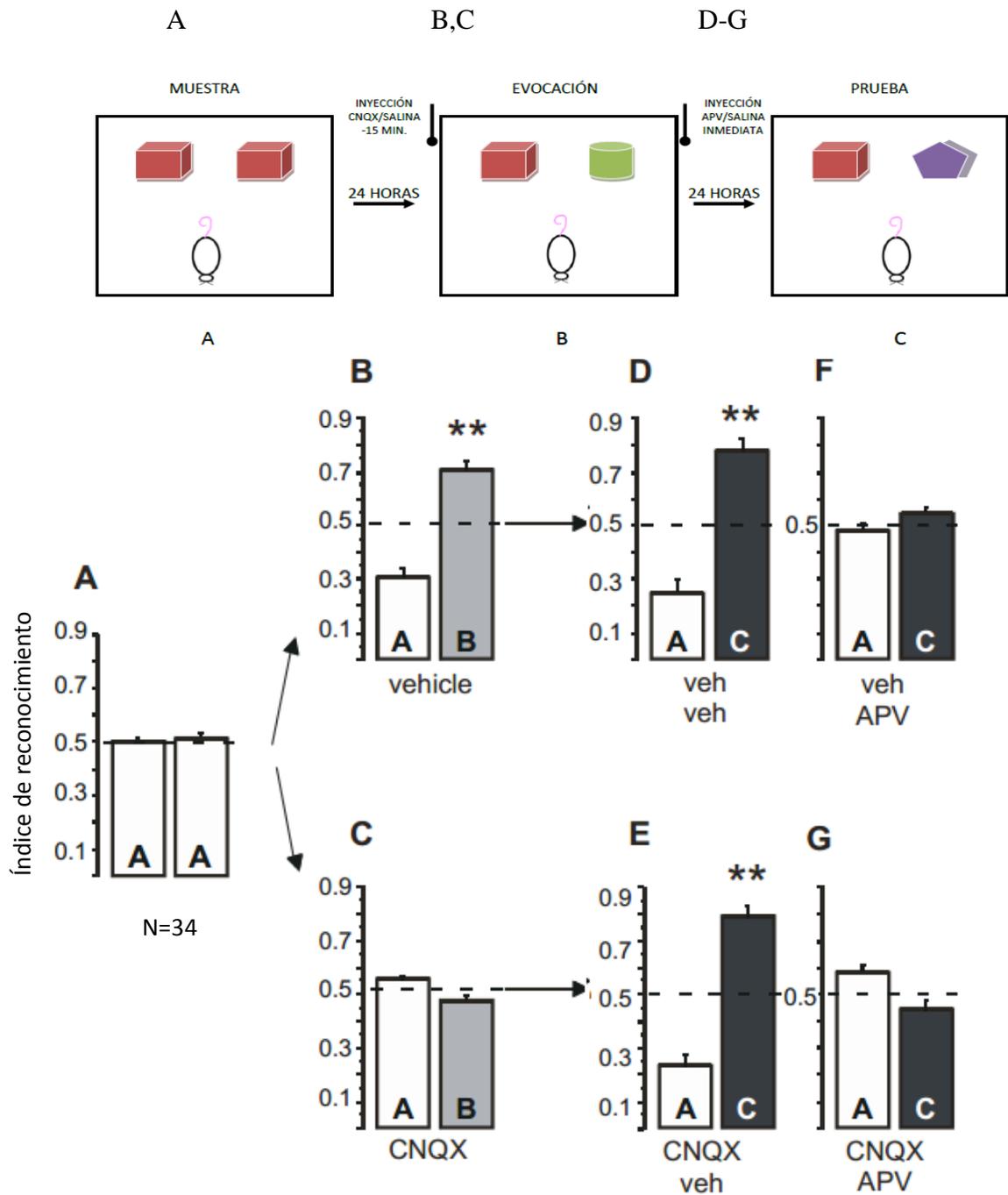


Figura 14. En la parte superior se muestra el protocolo conductual. En la parte central se muestran los índices de reconocimiento para la fase de muestra (A), evocación (B y C) y prueba (D-G). Se observa que los animales que fueron inyectados con salina en la evocación, muestran preferencia por el objeto novedoso (B) a diferencia de los animales inyectados con CNQX que no tienen preferencia por ninguno de los dos objetos (C). En la prueba de memoria se observa que los animales que tuvieron inyección de vehículo mostraron preferencia por el objeto novedoso en la prueba, revelando que la reconsolidación siguió su curso a pesar del bloqueo de la evocación (E) o sin el bloqueo (D). Por otro lado, la inyección de APV después de la evocación impidió la reconsolidación, sin importar si la evocación fue bloqueada o no, ya que los animales no tuvieron preferencia por ningún objeto (F y G). \*\*  $p < 0.0001$  Los grupos fueron: SAL/SAL (n= 8), SAL/APV (n= 9), CNQX/SAL (n= 10), CNQX/APV (n= 10).

## 5.2 ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA

Para confirmar que la evocación de la memoria no es indispensable para que ocurra la reconsolidación en la memoria de reconocimiento, se utilizó el paradigma de atenuación de la neofobia. Se manipularon los receptores tipo AMPA de la corteza perirrinal 15 minutos antes de la evocación y los receptores tipo NMDA inmediatamente después de ésta para determinar que la memoria fue reactivada, así como su participación en la reconsolidación.

Como se observa en la Figura 15 (promedio de línea base), los animales tienen un promedio de consumo similar y sin diferencias entre grupos (prueba ANOVA,  $F(3,32) = 1.152$ ,  $p = .3432$ ).

Como se observa en la figura 15 (sacarina 1), todos los grupos presentaron neofobia, es decir, una disminución significativa del consumo de sacarina en comparación con el promedio de su línea base de consumo (prueba *t-student* pareada,  $p < 0.0001$ ).

En el consumo de sacarina 2 (ver figura 15, sacarina 2), los animales inyectados con solución salina 15 minutos antes de la ingesta de sacarina presentaron atenuación de la neofobia o reconocimiento seguro del sabor a diferencia de aquellos animales inyectados con CNQX, antagonista de los receptores tipo AMPA, 15 minutos antes del consumo de sacarina.

Se encontraron diferencias, estadísticamente significativas entre el grupo CNQX-APV y SAL-APV; ( $p = 0.0005$ ) y CNQX-APV y SAL-SAL ( $p = 0.0046$ ); CNQX-SAL y SAL APV; ( $p < 0.0001$ ) y CNQX-SAL y SAL-SAL ( $p < 0.0001$ ).

En el consumo de sacarina 3 realizada 24 horas después de la evocación (ver figura 15, sacarina 3), se observa que los animales que tuvieron inyección de solución salina inmediatamente después de la ingestión de sacarina 2, presentaron atenuación de la neofobia o reconocimiento seguro del sabor a diferencia de los animales que tuvieron inyección de APV que presentan una disminución en el consumo o un daño en el reconocimiento del sabor segura; es decir, un daño en la reconsolidación de la memoria del sabor.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre aquellos animales inyectados con APV; CNQX-APV y SAL-APV; ( $p = .5071$ ) y CNQX-SAL y SAL-SAL ( $p = < 0.9461$ ) y hay diferencias estadísticamente significativas entre CNQX-APV y SAL-SAL ( $p = 0.0302$ ) y CNQX-SAL y SAL APV ( $p = < 0.0041$ ).

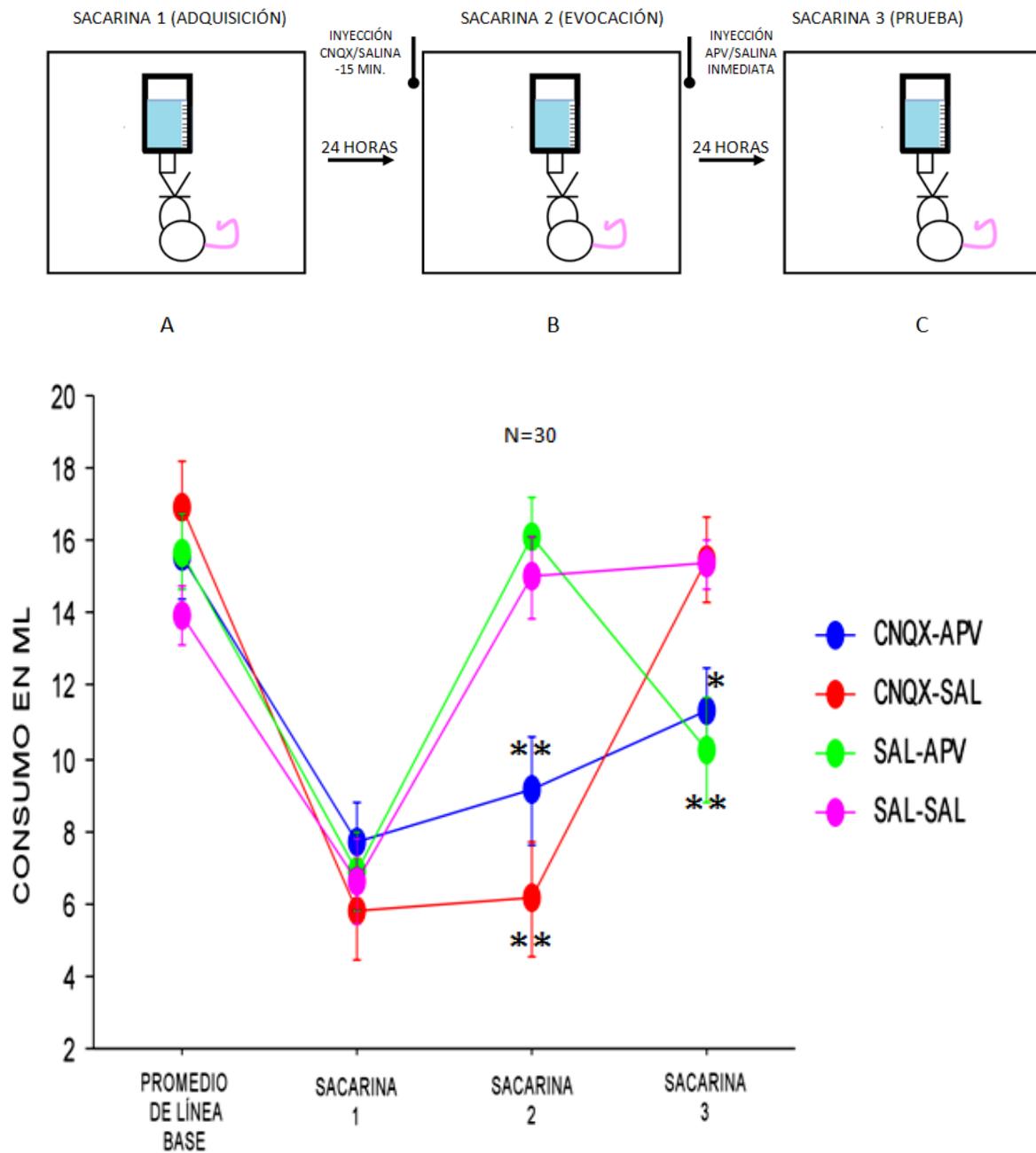


Figura 15. En la parte superior se muestra el protocolo conductual. Se muestra el consumo en ml respecto a cada fase del experimento. Media y error estándar de la media de la línea base de consumo en función de los grupos. No se observaron diferencias entre ellos. En sacarina 1(A) se muestra la neofobia al sabor novedoso sin diferencias entre grupos. Se observa que la inyección de CNQX (rojo y azul), bloquea la evocación (sacarina 2, B) mientras que la inyección de solución salina (rosa y verde) no tiene efecto. Por otra parte la inyección de APV posterior a evocación (verde y azul), dañó la reconsolidación efecto que se observa en la prueba (sacarina 3, C), mientras que la inyección de solución salina (rojo y rosa) no tiene efecto aun cuando los animales tuvieron bloqueada la evocación (grupo CNQX-SAL) se observa un reconocimiento seguro del sabor y su consiguiente atenuación observado como un aumento en el consumo. \*\* < 0.02 entre el grupo experimental contra el grupo control. \* < 0.05 entre el grupo experimental contra el grupo control.

## VI DISCUSIÓN

En este estudio se infundieron en la corteza perirrinal fármacos específicos de antagonistas de receptores glutamatérgicos, CNQX para receptores AMPA y APV para los receptores NMDA y se demostró que tienen efectos diferenciales en la evocación y la reconsolidación en los paradigmas de reconocimiento de objetos y reconocimiento seguro del sabor. En los experimentos realizados, el CNQX bloqueó la evocación de la memoria de reconocimiento mientras que el APV dañó su reconsolidación. Los resultados muestran que la evocación de la memoria de reconocimiento no es necesaria para que ésta pase a un estado activo y se permita la reconsolidación.

## 6.1 BLOQUEO DE RECEPTORES AMPA Y SU IMPLICACIÓN EN LA EVOCACIÓN

La evidencia farmacológica sugiere que la activación de los receptores de glutamato tipo AMPA es necesaria para la evocación de la memoria y diferentes estudios han demostrado que al antagonizar dichos receptores con fármacos como CNQX o NBQX en diversas tareas como condicionamiento al miedo (Ben-Mamou *et al.*, 2006), el reconocimiento de objetos (Winters *et al.*, 2008) y el condicionamiento aversivo al sabor (Yamamoto *et al.*, 2004; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012) se observa un bloqueo de la evocación cuando la inyección del fármaco se realiza 15 minutos antes de la ejecución de la tarea, lo que sugiere que durante su ejecución, no hay actividad de los receptores (Day *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008), lo cual impide que existan sinapsis que indiquen si el estímulo es novedoso o familiar. Dicha evidencia farmacológica es consistente con lo que se observa en la conducta de los experimentos realizados; es decir, un déficit en el reconocimiento, ya sea en reconocimiento de objetos o de sabores; sin embargo, es importante recalcar que dicho bloqueo no tiene implicaciones en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento. Lo que se sugiere que la evocación no es una condición necesaria para que ocurra la reconsolidación.

Un trabajo reciente (Hong *et al.*, 2013), estudió la participación de diferentes conformaciones del receptor de glutamato tipo AMPA que tienen características funcionales distintas, una de ellas es su permeabilidad al calcio y se dividen en receptores permeables a calcio (CP-AMPA) y receptores impermeables a calcio (CI-AMPA) (Shi, S. *et al.*, 2001). Los CP-AMPA tienen implicaciones en la consolidación de la memoria de condicionamiento al miedo, mientras que la evocación induce un intercambio de CP-

AMPA por CI-AMPA en la superficie de la membrana, dicho intercambio es determinado como clave para que una memoria pase de un estado estable a uno inestable (Hong, I. *et al.* 2013) y gradualmente ocurre nuevamente un intercambio entre CP-AMPA a CI-AMPA que coincide con el curso de la reconsolidación. El bloqueo de la endocitosis de CI-AMPA o del receptor NMDA, previene la desestabilización, así como el bloqueo de CP-AMPA a CI-AMPA previene la reconsolidación (Hong *et al.* 2013), esto sugiere, que los receptores tipo AMPA además de participar en la evocación, también tienen implicaciones en la transformación de una memoria consolidada a su estado activo, así como en su reconsolidación y que este intercambio es desencadenado por la activación del receptor NMDA. Esto fue estudiado en amígdala tanto en la evocación como en la reconsolidación del condicionamiento al miedo y en contraste con los resultados de los experimentos realizados en la tarea de reconocimiento de objetos y sabores en corteza perirrinal de ratas, se sabe que la evocación requiere de un intercambio de receptores AMPA, en donde el fármaco CNQX bloquea la transmisión sináptica glutamatérgica, pero no previene el intercambio de los receptores, por lo que la reconsolidación puede seguir su curso, además de que el receptor NMDA no está bloqueado. Por otro lado, el fármaco APV antagonista del receptor NMDA, bloquea el intercambio de CP-AMPA por CI-AMPA previniendo la reconsolidación y esto es consistente con lo encontrado en la tarea de reconocimiento de objetos y sabores.

## 6.2 FUNCIÓN DE LA EVOCACIÓN EN LA RECONSOLIDACIÓN

Para que un recuerdo pase a un estado activo de alguna manera se debe involucrar la activación inicial de redes relevantes y es comúnmente demostrada con la evocación (Sara, 2000). En ratas, la evocación es generalmente estudiada a través de su expresión conductual. Muchos paradigmas que investigan mecanismos moleculares asociados al proceso de evocación, involucran principalmente sesiones de re-exposición a la situación del entrenamiento que producen la respuesta conductual asociada como evitación, congelamiento o reconocimiento (Botreau *et al.*, 2006); así como mecanismos moleculares de reactivación (Botreau *et al.*, 2006; Caffaro, 2012; Hong *et al.*, 2013) sin embargo, en realidad es poco lo que se sabe respecto a este proceso.

Para poder determinar ciertos eventos celulares asociados a la evocación y la reconsolidación, se realizó un estudio asociado a la vía de transducción de señales asociadas a receptores de tirosina, que tras una cascada de eventos moleculares terminan con la activación de ERK. ERK es una proteína que es capaz de traslocarse al núcleo para regular la transcripción, modificando la actividad de proteínas modulando así la expresión de distintos genes que están asociados tanto al proceso de consolidación como el de evocación y reconsolidación. En este estudio, (Botreau *et al.*, 2006) la regulación de ERK en la evocación cuando la reactivación es disociada de su respuesta conductual, es medida con niveles de ERK fosforilado en la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo. Los autores concluyeron que la exposición a pistas de la evocación (estímulo condicionado), tiene consecuencias además de conductuales, moleculares que propicia la regulación de la fosforilación de ERK. Por lo que esto sugiere que la activación del trazo de

memoria va más allá de una respuesta conductual y que es más específica de varias señales moleculares que la regulan. Por lo que es importante determinar si el bloqueo de la evocación por medio de antagonistas de los receptores AMPA sin impedir que la reconsolidación ocurra, es un efecto particular o puede ser generalizado.

En este sentido, datos recientes de nuestro laboratorio, sugieren que el bloqueo de la evocación por medio del fármaco muscimol, que es un agonista de receptores GABAérgicos en la corteza perirrinal, bloquea la evocación de la memoria de reconocimiento de objetos, sin impedir que la reconsolidación ocurra cuando se realiza una prueba al día siguiente. También fue estudiado en otro laboratorio mediante el bloqueo de receptores muscarínicos con escopolamina, y se demostró una disociación en la expresión conductual y la reactivación de la memoria en un experimento que mide un cambio en la estrategia de defensa de cangrejos para responder a un estímulo visual peligroso. La administración de escopolamina bloquea la evocación, sin embargo, en una sesión de prueba posterior, se observa que la memoria fue fortalecida y que hubo reconsolidación (Caffaro *et al.* 2012).

Esto sugiere, que el efecto del bloqueo de la evocación no es exclusivo de los receptores tipo AMPA, ya que la evocación puede bloquearse utilizando antagonistas para otros sistemas de neurotransmisión como el GABA con el fármaco muscimol o acetilcolina con el fármaco para receptores muscarínicos escopolamina. Sin embargo, es consistente la premisa de que la evocación es independiente de la reactivación y la reconsolidación, tanto en tareas aversivas como en tareas que no lo son como el reconocimiento de objetos y sabores.

### 6.3 REACTIVACIÓN DEL TRAZO DE LA INFORMACIÓN ALMACENADA EN MEMORIA

En los resultados (figura 14 y 15) se observa un bloqueo de la evocación de la memoria de reconocimiento tanto de objetos como de sabores en aquellos animales que tuvieron inyección del fármaco CNQX, antagonista de receptores tipo AMPA en la corteza perirrinal. Se determina que hay una reactivación del trazo demostrada en aquellos animales inyectados con el fármaco APV en corteza perirrinal ya que presentaron un déficit en el reconocimiento tanto de objetos como del sabor; demostrando un daño en la reconsolidación. Sin embargo, el bloqueo de la evocación no tiene ningún efecto sobre su reconsolidación. Esto recalca la importancia tanto de los receptores AMPA en la evocación y los receptores NMDA en la reconsolidación.

Estos resultados aportan evidencia de que la memoria pasa de un estado inactivo a uno activo y en este sentido, al menos unos de los eventos celulares que ocurren durante la consolidación inicial se desencadenan (Sara, 2000). Hasta qué punto la cascada de eventos celulares en la post-adquisición es recapitulada cada vez que la memoria es activada y reorganizada, probablemente está en función de la edad y complejidad de la memoria, así como la cantidad de nueva información a ser integrada en el trazo de memoria. Otros factores pueden ser la atención, la motivación, etc. (Sara, 2000).

La principal evidencia de que ocurre la reactivación, y que es pilar dentro de la teoría de la consolidación, es la amnesia de una experiencia en particular, que resulta posteriormente a un tratamiento amnésico como un choque electroconvulsivo (Duncan *et al.*, 1949), inhibición de la síntesis de proteínas (Misanin *et al.*, 1968) o bloqueo de los receptores NMDA (Winters *et al.*, 2008) durante la evocación de una tarea, demostrando así que la

evocación de la memoria previamente consolidada regresa a un estado lábil (Nader *et al.*, 2009) y que este efecto amnésico ocurre sólo cuando las manipulaciones son aplicadas en un periodo corto después de la reactivación (Nader *et al.*, 2000) por lo cual, al observarse un efecto del fármaco antagonista del receptor NMDA, sugiere que hubo reactivación de la memoria y que este receptor es crítico para que ocurra el proceso de reconsolidación. Sin embargo, no es necesario que exista evocación, ya que las ratas tuvieron un bloqueo de ella mediante el fármaco CNQX y es observable a nivel conductual como un déficit en el reconocimiento de los estímulos (ver figuras 14 y 15).

Es necesario aclarar que la memoria es reactivada por lo menos bajo la condición de presentarse estímulos asociados al trazo de memoria, por ejemplo, el estímulo condicionado sin el estímulo incondicionado (Dudai, 2004, Nader *et al.*, 2000) o cuando la información presentada representa una oportunidad de actualización de un trazo previo (Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012), es decir, que la nueva información tenga la fuerza suficiente sobre el trazo previo (Wichert *et al.*, 2013).

## 6.4 IMPLICACIONES CLÍNICAS

La persistencia de un recuerdo, la capacidad de actualizarlo y el olvido son partes esenciales de la memoria y deben tener la misma importancia para comprender los mecanismos que subyacen a ellos. Los experimentos realizados aportan evidencia de que la evocación no es necesaria para que el mecanismo de activación de la memoria comience en la memoria de reconocimiento y esto es de gran importancia para el estudio de otros mecanismos de activación de la memoria, así como una gran oportunidad terapéutica para el tratamiento de aquellas memorias indeseadas. Un enfoque novedoso es disminuir la asociación del evento traumático con su respuesta fisiológica y así poder modificar el recuerdo o extinguirlo (Debiec, 2011), lo cual ha sido realizado con humanos en una investigación reciente que ha demostrado que es posible atenuar la hiperreactividad ante un estímulo aversivo mediante la administración de propranolol, un antagonista de receptores beta adrenérgicos, que además de bloquear la evocación de respuestas fisiológicas durante 24 horas, evita que la expresión de miedo regrese (Kindt *et al.*, 2009).

Esto demuestra que la atenuación de la evocación del miedo no interfiere con la posibilidad de reactivar el trazo, en este caso, disminuye la asociación y permite que un proceso de extinción ocurra.

Los resultados también permiten un nuevo enfoque al proceso de la memoria que apunta no sólo a mejorar la eficacia de las memorias que se desean conservar y la actualización de las mismas, sino también a desencadenar un olvido óptimo de aquello que resulta desadaptativo.

## VII LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

El bloqueo de la evocación por medio de la inhibición transitoria de los receptores AMPA en la corteza perirrinal, ha demostrado no tener efectos en la reconsolidación de la misma en un modelo de reconocimiento de objetos y sabores. Sin embargo, es importante realizar más estudios para determinar si es un fenómeno generalizable con otras estructuras y otros sistemas de neurotransmisión en diversos modelos de memoria y comprender así mejor el mecanismo de evocación o recuperación de la información ya que la visión tradicional apunta a estudios consolidación y reconsolidación dejando de lado la posibilidad de que muchas veces el olvido no es producto de un daño en la consolidación o reconsolidación, sino una falla en la recuperación, es decir, la evocación.

Es necesario realizar niveles a nivel molecular y celular para determinar el mecanismo que subyace a la reconsolidación que en este caso es independiente de la actividad de receptores AMPA en la corteza perirrinal, así como en otras estructuras en donde se ha determinado la participación de los receptores AMPA en la evocación para comprender mejor este mecanismo.

Además, es importante recalcar la relevancia del estudio de la corteza perirrinal y la participación de receptores glutamatérgicos en ella como una posible fuente de trastornos de la memoria en enfermedades neurodegenerativas o lesiones cerebrales, tanto para entender la neurobiología y las patologías del mecanismo de adquisición, evocación, consolidación y reconsolidación de la memoria, para una posibilidad terapéutica en diversos trastornos psiquiátricos.

## VIII CONCLUSIONES GENERALES

La manipulación farmacológica de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA en la corteza perirrinal nos permitió bloquear la evocación de la memoria de reconocimiento y demostrar que es independiente de la reactivación y la reconsolidación de la misma.

Estos resultados sugieren una disociación molecular entre la evocación y la reconsolidación y que la evocación no es necesaria para que se inicie el proceso de reconsolidación en el modelo de memoria declarativa para ratas de reconocimiento de objetos y atenuación de la neofobia.

## IX REFERENCIAS

- Akkerman, S., Blokland A, Reneerkens O, van Goethem NP, Bollen E, Gijssels HJ, Lieben CK, Steinbusch HW, Prickaerts J. (2012) Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behavioral Brain Research*. 1;232(2):335-347.
- Alberini, C.M. (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neuroscience*. 28:51-56.
- Bailey, M.R., Balsam P.D. (2013) Memory reconsolidation: time to change your mind. *Current Biology*. 23(6):243-245.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C.J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J.L., Bermudez-Rattoni, F. (2008) The consolidation of object and context recognition memory involves different regions of the temporal lobe. *Learning and Memory*. 15, 618–624.
- Bartko, S.J., Winters, B.D., Cowell, R.A., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2007) Perceptual functions of perirhinal cortex in rats: zero-delay object recognition and simultaneous oddity discriminations. *Journal of Neuroscience*. 27, 2548–2559.
- Bartko, S.J., Winters, B.D., Cowell, R.A., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2007). Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in configural object recognition and perceptual oddity tasks. *Learning and Memory*. 14, 821–832.
- Bear, M.; Connors, B; Paradiso, M. (2007) Neurociencia: explorando el cerebro. Barcelona: Masson. Caps. 24 y 25, pp. 755-793.

- Ben-Mamou, C., Gamache, K., Nader, K. (2006) NMDA receptors are critical for unleashing auditory fear memories. *Nature Neuroscience*. 9, 1237-1239.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 5,209-217.
- Bermudez-Rattoni, F, Nuñez-Jaramillo L, Balderas I. (2005) Neurobiology of taste-recognition memory formation. *Chemical Senses*. 30 (Suppl 1), 156-157.
- Bermudez-Rattoni, F, Okuda, S., Roozendaal, B., McGaugh, J.L. (2005) Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*. 12(5):447-449.
- Botreau, F., Gisquet-Verrier, P. (2006) Memory reactivation, dissociated from behavioral expression, decreases ERK phosphorylation in the rat prefrontal cortex and amygdala. *Behavioural Brain Research*. 169,176-180.
- Brown, M. W., Aggleton, J. P. (2001) Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Review Neuroscience*. 2,51–61.
- Brown, M. W., Bashir, Z.I. (2002) Evidence concerning how neurons of the perirhinal cortex may effect familiarity discrimination. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Biological Sciences*. 357(1424): 1083–1095.
- Brown, M. W., Barker, G.R.I., Aggleton, J. P., Warbuton, E.C. (2012)What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirrhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia*. 50: 3122-3140.
- Caffaro, P.A., Suarez, L.D., Blake, M.G., Delorenzi,A. (2012) Dissociation between memoryreactivation and its behavioral expression: Scopolamine interferes with

memory expression without disrupting long-term storage. *Neurobiology of Learning and Memory*. 98, 235-245

Cazakoff, B.N., Howland, J.G.(2011) AMPA receptor endocytosis in rat perirhinal cortex underlies retrieval of object memory. *Learning and Memory*. 18(11):688-692.

Clark, R. E., Martin, S.J. (2005) Interrogating rodents regarding their object and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology*. 15 (5), 593-598.

Clark, R. E., Martin, S.J., Squire, L.R. (2010) An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia*. 48(8):2234-2244.

Conn, P.J., Pin, J.P. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 37:205-237.

Day, M., Langston, R., Morris, R.G. (2003) Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval or paired-associative learning. *Nature*. 424: 205-209.

Domjan, M. (1976) Attenuation and enhancement of neophobia for edible substances. In: Barker LM, Best MR, Domjan M, editors. *Learning Mechanisms in Food Selection*. Baylor, University Press; Texas: 1977, 151–180.

Dudai, Y. (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*. 12(2):211-216.

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

Duvarci, S., Nader, K. (2004) Characterization of fear memory reconsolidation. *Journal of Neuroscience*. 24:9269-9275.

- Duvarci, S., Nader, K., LeDoux, J.E. (2005) Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *European Journal of Neuroscience*. 21:283-289.
- Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. (2008) De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdale. *Learning and Memory*. 15: 747-755.
- Ennaceur, A., Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*. 31,47–59.
- Gutierrez, R., Tellez, L.A., Bermudez-Rattoni, F. (2003) Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *European Journal of Neuroscience*. 17:1556-1562.
- Gutierrez, R., De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C.J., Bermudez-Rattoni, F.(2004) Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learning and Memory*. 11(1):95-101.
- Hong, I., Kim,J., Kim,J., Lee,S., Ko, H-G., Nader, K., Kaang,B-K., Tsien, R.W., Choi,S. (2013) AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 14;110(20):8218-8223.
- Hupbach, A., Gomez, R., Hardt, O., Nadel, L. (2007) Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learning and Memory*. 14(1-2):47-53.

- Kandel, E.R. , Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (2000) Principles of Neural Science. 4<sup>th</sup>.Edition, McGraw-Hill.
- Kandel, E.R. (2001) The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*. 294: 1030-1038.
- Lechner, H.A., Squire, L.R., Byrne, J.H. (1999) One hundred years of consolidation: remembering Muller and Pilzecker. *Learning and Memory*. 6:77-87.
- Lee, J.L., Everitt BJ, Thomas KL. (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*. 304:839-843.
- Lee, J.L. (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*. 11(11):1264-1266.
- Lee, J.L., Everitt, B.J. (2008) Appetitive memory reconsolidation depends upon NMDA receptor-mediated neurotransmission. *Neurobiology of Learning and Memory*. 90(1):147-154.
- Lewis, D. J. (1979) Psychobiology of active and inactive memory. *Psychological Bulletin*. 86(5), 1054-1083.
- Li, Q., Burrell, B.D. (2008) CNQX and AMPA inhibit electrical synaptic transmission: a potential interaction between electrical and glutamatergic synapses. *Brain Research*. 4;1228:43-57
- Mesches, M.H., Bianchi, M. & McGaugh, J.L. (1996) The effects of Intra-amygdala Infusion of the AMPA Receptor Antagonist CNQX on Retention Performance Following Aversive Training. *Neurobiology of Learning and Memory*. 66, 324-340.
- McGaugh, J.L (2000) Memory- A century of consolidation. *Science*, 287, 248-251.

- Miller, E. K., Gochin, P. M., Gross, C. G. (1991) Habituation-like decrease in the responses of neurons in inferior temporal cortex of the macaque. *Visual Neuroscience*. 7, 357–362.
- Milner, B., Squire, L.R., Kandel, E.R. (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20, 445-468.
- Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J. (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*. 160:554-555.
- Nader, K., Schafe, G., LeDoux, J.E. (2000) The labile nature of consolidation theory. *Nature Review Neuroscience*. 1(3):216-219.
- Nader, K. (2003) Memory traces unbound. *Trends in Neuroscience*. 26:65-72.
- Nader, K., Einarsson, E.O. (2010) Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1191: 27–41.
- Paxinos, G., Watson, C. (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact 3<sup>rd</sup>. Ed. Academic Press, San Diego, CA: Academic Press.
- Prado-Alcala, R.A., Medina, A.C., Lopez, N.S., Quirarte, G.L. (2012) Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Review Neuroscience*. 23(5-6):501-508.
- Przybylski, J., Sara, S.J. (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioral Brain Research*. 84:241-246.

- Rodriguez-Ortiz, C.J, De la Cruz, V., Gutierrez, R., Bermudez-Rattoni, F. (2005) Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning and Memory*. 12:533-537.
- Rodriguez-Ortiz, C.J, Bermudez-Rattoni, F. (2007). Memory Reconsolidation or Updating Consolidation?. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 11.
- Rodriguez-Ortiz, C.J, Balderas, I., Garcia de la Torre, P., Bermudez-Rattoni, F. (2012) Taste aversion memory reconsolidation is independent of its retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*. 98(3):215-219.
- Sara, S.J. (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*. 7: 73-84.
- Scoville, W.B. & Milner, B. (1957) Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (1957) vol. 20 (11) pp. 11-21
- Shi, S., Hayashi, Y., Esteban, J.A., Malinow, R. (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105(3):331-343.
- Squire, L.R., Zola, S.M.(1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*. 26;93(24):13515-13522.
- Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning Memory*. 82, 171–177.

- Squire, L.R., Wixted, J. T., & Clark, R. E. (2007) Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*. 8(11), 872–883.
- Squire, L.R. (2009) Memory and Brain Systems: 1969–2009. *Journal of Neuroscience*. 29(41): 12711–12716.
- Summers, M.J., S.F. Crowe, and K.T. (1997) Administration of DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) induces transient inhibition of reminder-activated memory retrieval in day-old chicks. *Brain Research in Cognitive Brain Research*. 5: 311–321.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., Kida, S. (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*. 24:4787-4795.
- Wagner, A.D., Schacter, D.L., Rotte, M., Koutstaal, W., Maril, A., Dale, A.M., Rosen, B.R., Buckner, R.L. (1998) Building memories: remembering and forgetting of verbal experiences as predicted by brain activity. *Science*. 281:1188–1191.
- Wang, H., Hu, Y., Tsien, J.Z. (2006) Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology*. 79, 126-135.
- Wichert, S., Wolf, O. T., Schwabe, L. (2013) Updating of episodic memories depends on the strength of new learning after memory reactivation. *Behavioral Neuroscience*. 127 (3), 331-338.
- Wichert, S., Wolf, O.T., Scwabe, L. (2013) Changing memories after reactivation: A one time opportunity? *Neurobiology of Learning and Memory*. 99: 38-49.
- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and

hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *Journal of Neuroscience*. 24, 5901–5908.

Winters, B. D., Bussey, T. J. (2005). Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *Journal of Neuroscience*. 25, 52–61.

Winters, B. D., Saksida, L. M., Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 32(5), 1055–1070.

Winters, B. D., Saksida, L. M., Bussey, T. J. (2010). Implications of animal object memory research for human amnesia. *Neuropsychologia*. 48, 2251-2261.

Winters, B. D., Reid, J.M. (2010). A distributed cortical representation underlies crossmodal object recognition in rats. *Journal of Neuroscience*, 30, 6253-6261.

Winters, B. D., Tucci, M.C., Jacklin, D.L., Reid, J.M., Newsome, J. (2011). On the dynamic nature of the engram: evidence for circuit-level reorganization of object memory traces following reactivation. *Journal of Neuroscience*. 31, 17719-17728.

Yasoshima, Y., Yamamoto, T., Kobayashi, K. (2000). Effects of the benzodiazepine agonist on the acquisition and expression of conditioned taste aversion in the rat. *Neuroscience Research*, 38, 99.

Yasoshima, Y., Yamamoto, T., Kobayashi, K. (2005). Amygdala-dependent mechanism underlying memory retrieval of conditioned taste aversion. *Chemical Senses*, 30(Supl.1) i158-159.