



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LA AMÍGDALA SOBRE
LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE UN ENTRENAMIENTO
INCREMENTADO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
ARACELI MARTÍNEZ MORENO

TUTOR PRINCIPAL
DR. ROBERTO A. PRADO ALCALÁ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

MÉXICO, D. F., OCTUBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de Examen certificamos que la tesis elaborada por: Araceli Martínez Moreno, cuyo título es: “Efecto de la inhibición de la transcripción en la amígdala sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario (Tutor)

Dr. Roberto A. Prado Alcalá

Vocal

Dra. Sofía Díaz Miranda

Suplente

Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez

Suplente

Dr. Víctor Hugo De Lafuente Flores

Aprobada por el Comité Académico

Coordinador del programa: Dr. Alfredo Varela Echavarría

Resumen

La síntesis de ARNm es necesaria para la consolidación de la memoria bajo condiciones de entrenamiento moderado. Otros estudios sugieren que la aplicación de tratamientos amnésicos no es efectiva en situaciones de entrenamiento incrementado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la inhibición de la transcripción, por la administración bilateral intra-amígdala de 5, 6- diclorobenzimidazole riboside (DRB), durante la consolidación de la memoria de ratas entrenadas en condiciones incrementadas en la tarea de evitación inhibitoria. Primero se determinó la dosis amnésica óptima, obteniéndose una curva dosis-respuesta administrando diferentes dosis de DRB (20, 40, y 80 ng/0.5 μ l/sitio) en ratas entrenadas con una intensidad baja de choque eléctrico (1 mA). Posteriormente se analizó el efecto de la dosis amnésica óptima de DRB en sujetos entrenados con una intensidad intermedia o alta (2.0 ó 3.0 mA). Los resultados muestran que la administración de DRB (40 y 80 ng/0.5 μ l/sitio) produjo un fuerte efecto amnésico cuando el entrenamiento fue conducido con 1.0 mA. Sin embargo, la administración de DRB (80 ng/0.5 μ l/sitio) en los grupos entrenados con 2.0 ó 3.0 mA no produjo deterioro en la memoria de largo plazo. Así pues, una situación de entrenamiento incrementado protege a la memoria contra el efecto amnésico de la inhibición de la transcripción en la amígdala. Estos resultados sugieren que en una situación de entrenamiento incrementado, la transcripción en la amígdala no es necesaria para la formación de la memoria de largo plazo. El sistema podría valerse de otros mecanismos para mantener la información.

Summary

Several experimental findings suggest that inhibition of mRNA disrupts memory consolidation under normal conditions of training. A growing body of evidence indicates that the administration of amnesic treatments is ineffective in conditions of enhanced training. The aim of the present work was to evaluate the effect of transcriptional inhibition, produced by bilateral intra-amygdala administration of 5, 6- diclorobenzimidazole riboside (DRB), on memory consolidation of rats subjected to enhanced training of inhibitory avoidance. First, the optimal amnesic dose of DRB was determined. To this end we did a dose-response curve by administering different doses of DRB (20, 40, and 80 ng/0.5 μ l/site) when the rats were trained with a low intensity of foot-shock (1.0 mA). Then, we analyzed the effect of the optimal amnesic dose of DRB when the subjects were trained with medium or high levels of foot-shock (2.0 or 3.0 mA). Our results show that DRB administration in doses of 40 and 80 ng/0.5 μ l/site produced a strong amnesic effect when training was conducted with a relatively low intensity of foot-shock (1.0 mA). However, DRB administration at a dose of 80 ng/0.5 μ l/site in the groups that had been trained with 2.0 or 3.0 mA, was ineffective in impairing long-term memory. Thus, a situation of enhanced training protects memory from the amnesic effect of transcriptional inhibition in the amygdala. These data support the view that in a situation of an enhanced training experience, transcriptional activity in the amygdala is not essential for formation of long-term memory.

AGREDECIMIENTOS

Concluye un ciclo en mi formación neurocientífica en el cual he crecido tanto académica e intelectualmente pero sobre todo personalmente y es importante agradecer a aquellas personas e instituciones que han contribuido a mi crecimiento.

En primera instancia a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde mis estudios de bachillerato me ha permitido nutrirme de conocimiento tanto cultural como académico. Gracias por generar los recursos que contribuyen al conocimiento y desarrollo de este país.

Gracias al Instituto de Neurobiología, en el cual viví una de las mejores experiencias en mi formación y quehacer científico. Al excelente cuerpo de investigadores y académicos que lo constituye y que hacen día a día que este instituto sea de los mejores a nivel Latinoamérica y muy reconocido internacionalmente, estoy muy orgullosa de haber formado parte de él. Gracias a mis profesores quienes además de ser brillantes científicos, me transmitieron en sus clases su pasión y dedicación por las neurociencias, lo cual siguió estimulando en mí la inclinación a continuar mi camino en las neurociencias y a seguir divirtiéndome y apasionándome con mi trabajo siempre de una forma limpia, ética y responsable.

Gracias a mi tutor y director de tesis el Dr. Roberto A. Prado Alcalá y a la Dra. Gina L. Quirarte quienes desde que comencé con este nuevo reto (mis estudios de Maestría en Ciencias, Neurobiología) me apoyaron y contribuyeron de forma importante a mi desarrollo como investigadora. Gracias por sus enriquecedoras críticas y observaciones, mi profundo respeto y admiración a su trabajo y a su persona.

A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso de quien recibí un constante apoyo, aprendizaje y colaboración como colega y como amiga para la realización de este trabajo.

A mi comité tutor, la Dra. Martha L. Escobar Rodríguez y la Dra. Ma. Isabel Miranda Saucedo quienes estuvieron en todo momento al pendiente de mi formación y me aportaron constructivas observaciones en cada uno de los cuatro exámenes tutelares, siento especial afecto y admiración hacia ustedes.

A los integrantes del comité de sinodales, la Dra. Sofía Díaz Miranda, el Dr. Mauricio Díaz y el Dr. Víctor Hugo de La Fuente Flores quienes realizaron enriquecedores comentarios para lograr la consolidación de este proyecto.

A los integrantes de la amplia familia que forma al laboratorio B-04, de quienes siempre sentí la camaradería y el apoyo como colegas y amigos.

Al Sr. Ángel Méndez Olalde, quien se encargó durante estos dos años del cuidado de mis sujetos experimentales y de quien siempre obtuve un trato amable, sincero y respetuoso.

A la M. V. Z. Norma Serafín López por su ayuda en la compra y disposición del material del laboratorio.

Al personal del bioterio, en especial al M. V. Z. José Martín García Servín por proporcionar los animales experimentales requeridos para la realización de los experimentos.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por su apoyo y ayuda para realizar mis trámites durante la estancia en la maestría.

Al personal de la biblioteca, en especial al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela.

A CONACYT por la beca otorgada (a A. M. M. 408044) sin la cual no habría podido realizar este posgrado, y por su apoyo a través del proyecto 128259

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Becario No. 303204165).

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM, por el apoyo otorgado a través del proyecto PAPIIT IN201712.

Muy especialmente a mis padres Javier y Juanita porque a pesar de la distancia siguieron apoyándome, comprendiéndome y motivándome a seguir alcanzando mis metas y a luchar por mis sueños. A mi hermana Gaby porque desde pequeña me instruyó y me impulsó a no darme por vencida, a ser tolerante a la frustración (que muy importante es en la vida de un científico) y a levantarme si estoy caída. A mis hermanos Javier y Arturo por estar siempre ahí cuando los necesito, por apoyarme y comprenderme, por recordarme el valor de una familia unida. Los amo.

A mi familia extendida, Vargas Trujillo por recibirme siempre con calidez en su hogar y por permitirme formar parte de eventos importantes y divertidos en su vida.

A Javier por estar conmigo a pesar de la distancia y juntos superar una prueba de fuego, por su comprensión, amor y apoyo en todo momento, por impulsarme a continuar con mi sueño, por ayudarme a ser mejor persona, por las sonrisas que me hace desbordar, por una infinidad de motivos... Te amo y te admiro.

A mis amigos tanto recientes como eternos, gracias por estar conmigo compartiendo, aprendiendo y divirtiéndonos en esta aventura que es la vida, especialmente a Andrés, Diana, Anabel, Penélope, Maribel (Bola), Hugo, Sandy y Ramón.

A la memoria de mis abuelos Lola, Lucio, Mele y Pedro, quienes fundaron los cimientos que me forjaron y me hace ser quien soy. En especial a mi abue Pedro del cual conservo aún recuerdos intactos de la infancia.

Puedo agradecer a cada una de estas personas porque conservo los recuerdos que he vivido con ellas, porque después de todo: “*nosotros somos nuestra memoria, nuestra historia*” (Kandel E. R.).

A mis padres y hermanos, mi gran ejemplo

A Javier Cuauhtzín, mi gran amor

Gracias

Los amo

We are, after all, our memories...

McGaugh J.

ÍNDICE

Resumen español	III
Summary	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Aprendizaje y memoria	2
2.1.1. Clasificación de la memoria y consolidación	2
2.1.2. Mecanismos moleculares de la memoria	3
2.2. El papel de la amígdala en la estabilización de memorias aversivas	6
2.3. Síntesis de ARNm y consolidación: inhibición de la transcripción empleando DRB	10
2.4. El efecto protector del entrenamiento incrementado contra la amnesia	14
3. Justificación	17
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	18
5.2. Objetivo general	18
5.3. Objetivos particulares	18
6. Metodología	18

6.1. Sujetos	18
6.2. Procedimiento experimental	19
6.2.1. Cirugía estereotóxica y administración de tratamientos	19
6.2.2. Aparatos	20
6.2.3. Tarea conductual. Evitación Inhibitoria (EI)	21
6.2.4. Análisis histológico	22
6.3. Diseño experimental	23
6.3.1. Fase I. Curva dosis/respuesta	23
6.3.2. Dependencia de estado	24
6.3.3. Memoria de corto plazo	25
6.3.4. Fase II. Efecto del entrenamiento con intensidades de estimulación aversiva intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA)	26
7. Análisis estadístico	27
8. Resultados	28
8.1. Fase I. Curva dosis/respuesta	28
8.1.1. Dependencia de estado	30
8.1.2. Memoria de corto plazo	32
8.2. Fase II. Efecto del entrenamiento con intensidades de estimulación aversiva intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA)	34
9. Discusión	37
10. Conclusiones	43

11. Bibliografía	46
12. ÍNDICE DE FIGURAS	53
13. ÍNDICE DE TABLAS	55
14. GLOSARIO DE ABREVIATURAS	56
APÉNDICE I	57

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución, tanto el ser humano como otras especies de organismos han sufrido modificaciones de tipo estructural y funcional en su sistema nervioso que les han permitido adaptarse a su ambiente favoreciendo de esta forma su subsistencia. Esta supervivencia es producto de la capacidad que tienen sus células nerviosas y gliales para adaptarse a los cambios en su ambiente interno y/o externo, a la experiencia adquirida, así como a cambios estructurales y funcionales producidos por lesiones. Cuando este fenómeno ocurre en el sistema nervioso central (SNC), es denominado plasticidad cerebral (Gispén, 1993). De hecho, la plasticidad es una importante propiedad del cerebro mamífero y refleja la capacidad de la actividad neuronal generada por una experiencia para modificar la función de circuitos neurales y subsecuentemente modificar pensamientos, sentimientos y la conducta. En particular, la plasticidad sináptica se refiere a las modificaciones de la fuerza o eficacia de la transmisión sináptica en sinapsis preexistentes dependientes de su actividad (Citri y Malenka, 2008).

El estudio de los mecanismos plásticos sobre los cuales se sustentan el aprendizaje y la memoria se realiza desde varios niveles de análisis (molecular, sináptico, de sistemas y conductual). El presente proyecto de investigación se basó en el análisis a nivel conductual, el cual ha sido posible gracias al desarrollo de diversos paradigmas y modelos.

Por otra parte, se ha descrito que para que una información o experiencia adquirida bajo condiciones de entrenamiento moderado se consolide se requiere tanto de síntesis proteínica *de novo* como de ARNm *de novo* (Bailey et al., 1999; Igaz et al., 2002; Da Silva et al., 2008; Cammarota et al., 2003; Duvarci et al., 2008). Se ha demostrado que ante un entrenamiento incrementado (una situación en la cual un sujeto recibe más sesiones de entrenamiento después de haberse alcanzado una asíntota o intensidades de estimulación aversiva relativamente altas), se genera un efecto protector contra tratamientos que normalmente son amnésicos (Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Durán, et al., 1990; Solana-Figueroa, et al., 2002; Rodríguez et al., 2008; Díaz-Trujillo, et al., 2009; Salado-Castillo et al., 2011; Prado-Alcalá et al., 2012).

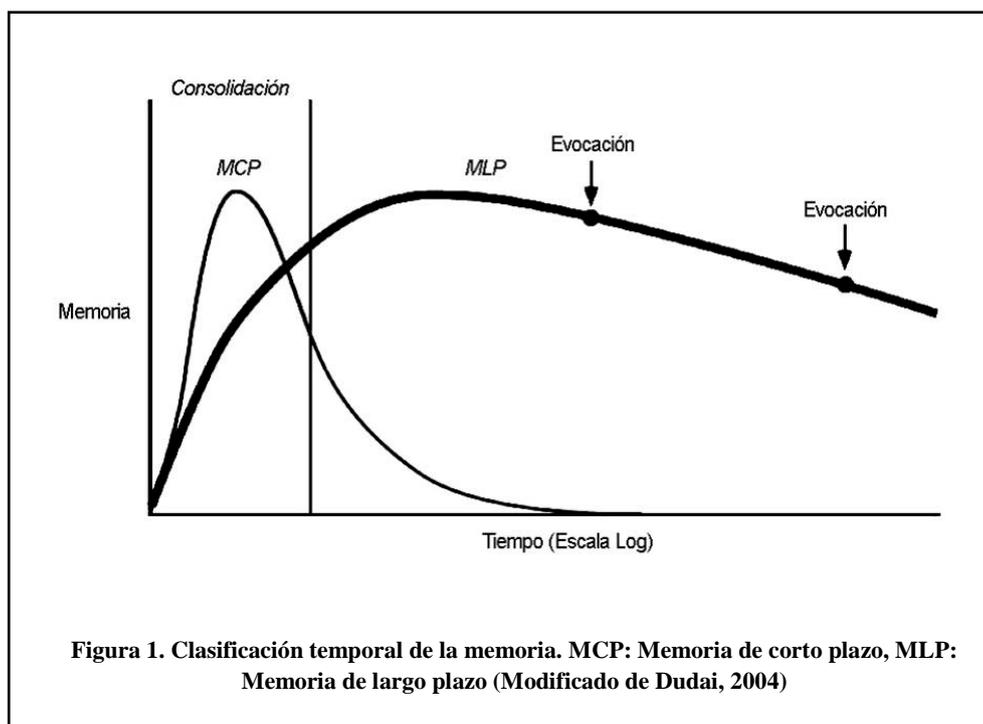
Con base en lo anterior, en el presente trabajo se planteó la evaluación del efecto de la inhibición de la transcripción en la amígdala después de un entrenamiento incrementado llevado a cabo con el paradigma de evitación inhibitoria.

2. ANTECEDENTES

2.1. APRENDIZAJE Y MEMORIA

2.1.1. Clasificación de la memoria y consolidación

Desde la perspectiva de las neurociencias, el aprendizaje es definido como un cambio en la conducta de un organismo debido a una experiencia previa, este fenómeno se expresa a través de cambios potenciales o relativamente permanentes puesto que es susceptible de ser modificado por otro estímulo ambiental. La memoria se refiere a un mecanismo que implica retención de la información previamente adquirida, la cual está sujeta a la evocación (Bear, et al., 2001; Sweatt, 2010). Para su estudio, este proceso se clasifica con base en una línea temporal de la información almacenada (Figura 1).



Como podemos observar en la figura 1, existe una transición de la memoria de corto plazo a la memoria de largo plazo, que depende de varias características intrínsecas al evento, lo cual ocurre dentro de un periodo denominado consolidación. Se ha descrito que este proceso se refiere a una progresiva estabilización post adquisición de la información hacia el largo plazo, que es dependiente del tiempo y durante la cual la memoria es susceptible de ser alterada. La propuesta del requerimiento de esta fase para generar un trazo de memoria estable fue desarrollada por Müller y Pilzecker desde principios del siglo XX (Squire y Kandel, 2000).

Es importante indicar que la consolidación se divide en dos tipos: *consolidación a nivel celular o sináptico*, la cual es rápida e implica eventos moleculares y celulares que ocurren inmediatamente después del entrenamiento y no van más allá de minutos, horas o días; y *consolidación de sistemas*, que es lenta e implica la participación de diferentes regiones neocorticales, y su interacción con estructuras del lóbulo temporal medial reorganiza el material de información reciente (Dudai, 2004; Medina et al., 2008).

2.1.2. Mecanismos moleculares de la memoria

El médico Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), premio Nobel de Medicina en 1906, fue el primer científico en sugerir que el número y la fortaleza de las conexiones sinápticas eran una base física del aprendizaje y el sostén de la memoria (Ramón y Cajal, 1984; citado por Morgado-Bernal, 2011). Posteriormente, el psicobiólogo Donald O. Hebb propuso a la plasticidad asociativa como un mecanismo del aprendizaje y la memoria en el que la coincidencia de la actividad pre y post sináptica es viable para modificar las conexiones neuronales en algunas estructuras en el cerebro (Hebb, 1949). En la actualidad se reconoce un modelo que explica estas modificaciones plásticas en el sistema nervioso. En 1973 Norwich Terje Lomo y Timothy Bliss descubrieron que la estimulación moderada de alta frecuencia en la misma vía hipocampal producía un estable y duradero incremento en la respuesta sináptica, que podría durar días e incluso semanas en animales intactos. Este fenómeno fue denominado potenciación de largo plazo (LTP por sus siglas en inglés) (Bliss y Lomo, 1973).

Las investigaciones que se han realizado en relación a los mecanismos moleculares y celulares que subyacen al aprendizaje y la memoria han tenido mucho progreso desde

décadas pasadas por el empleo de la LTP como modelo experimental. La LTP se refiere al incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación de las vías aferentes en un área determinada del Sistema Nervioso. Se ha descrito que los fármacos antagonistas de los receptores NMDA, como el D -AP5 (D -2-amino-5-fosfonovalerato) evitan la inducción de la LTP (Harris et al., 1984), lo cual sugiere que los receptores NMDA son un “switch” molecular crucial para la inducción de la LTP. Este tipo de receptores normalmente se encuentran inactivos. Durante la actividad de las conexiones sinápticas, las terminales presinápticas liberan el neurotransmisor glutamato al espacio extracelular, el cual activa a los receptores AMPA de la neurona postsináptica dando lugar a la entrada de sodio (Na^+) al interior de la célula. Los receptores NMDA también responden al glutamato pero se encuentran bloqueados por un ion de magnesio (Mg^{+2}), para remover el Mg es necesaria la despolarización de la membrana, lo cual ocurre debido a la entrada de iones como el Na^+ a través de otros canales como AMPA (Malenka y Bear, 2004; citados por Gómez-Palacio Sjectnan, 2009). Cuando los receptores NMDA son activados, además de favorecer la entrada de iones de Na^+ , también permiten la entrada de calcio (Ca^{2+}). El Ca^{2+} que ingresa a través de los receptores NMDA una vez que son activados, activa una molécula de señalización llamada calmodulina, la cual desencadena diferentes vías de transducción al interior celular. Dentro de las proteínas activadas por la calcio calmodulina se encuentran la CaMKII, que se ha descrito como una enzima clave para la regulación de la fase temprana de la LTP y la formación de la memoria (Malinow et al., 1987; Silva et al., 1992; Mayford et al., 1995; Giese et al., 1998; Lisman et al., 2002; citados por Wang et al., 2006). Otras cinasas tales como PKC, y MAPK también están implicadas en la expresión de la LTP. Las modificaciones sinápticas dependientes de fosforilación mantienen la LTP por 1-3 horas, y este periodo es conocido como fase temprana de la LTP (E-LTP, por sus siglas en inglés) (Wang et al., 2006) (Figura2).

Se ha descrito también que la proteína calcio calmodulina activa la glicoenzima adenilato ciclasa, la cual produce adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a partir de las moléculas de adenosín trifosfato (ATP). Durante la inducción de la LTP, el AMPC activa la PKA. Al ser activada la PKA, se produce una disociación de su unidad reguladora de la catalizadora, favoreciendo la traslocación de la unidad catalizadora al interior del núcleo. Una vez en el núcleo, PKA transfiere grupos fosfato para la activación de factores de transcripción como CREB que participa en la modulación de la transcripción de un gran número de genes que contienen sitios responsivos a ella, denominados CRE (elementos responsivos al AMPC)

(Meinkoth et al., 1993; Lisman et al., 2002). Con relación a lo descrito previamente, se ha indicado que PKA, así como la vía de ERK están implicadas en el mantenimiento de la eficiencia sináptica por más de 3 horas. El mantenimiento prolongado de la LTP o también conocida como fase tardía de la LTP (L-LTP, por sus siglas en inglés) requiere de la activación del factor de transcripción como CREB y de síntesis de nuevas proteínas (Frey et al., 1988, citado por Wag et al., 2006) (Figura 2).

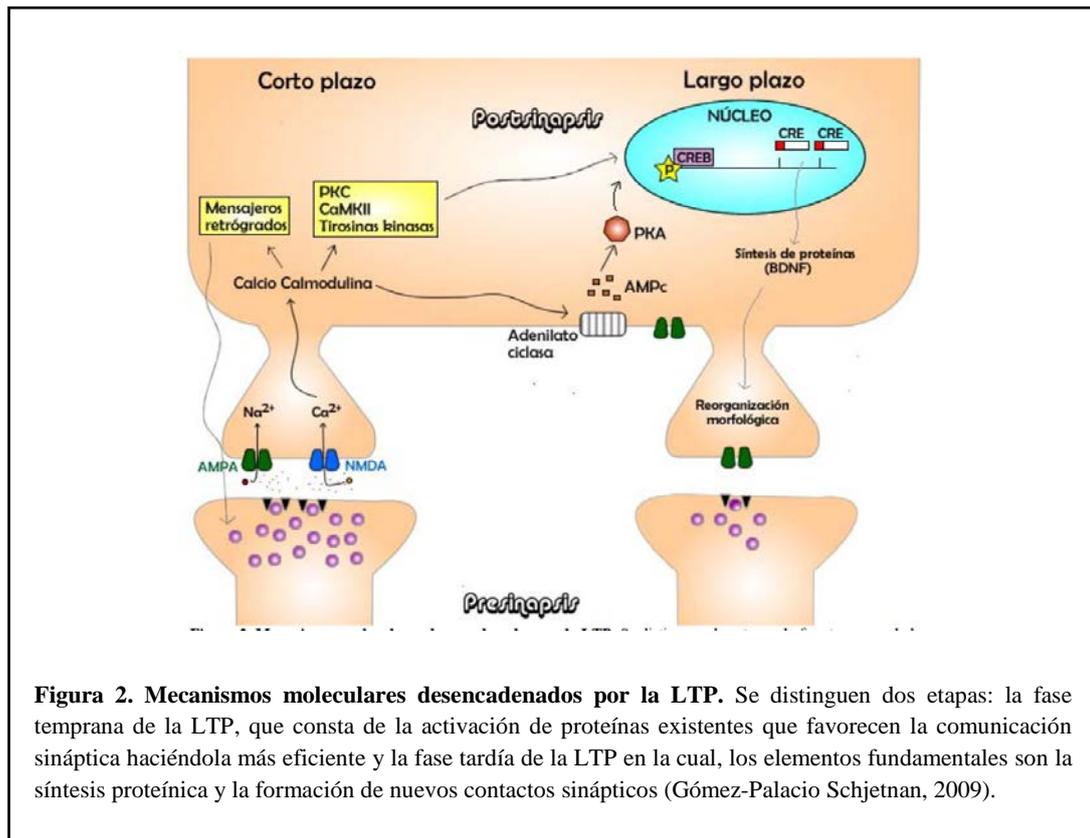


Figura 2. Mecanismos moleculares desencadenados por la LTP. Se distinguen dos etapas: la fase temprana de la LTP, que consta de la activación de proteínas existentes que favorecen la comunicación sináptica haciéndola más eficiente y la fase tardía de la LTP en la cual, los elementos fundamentales son la síntesis proteínica y la formación de nuevos contactos sinápticos (Gómez-Palacio Schjetnan, 2009).

Un gran cuerpo de evidencia sustenta que la formación de la memoria es un proceso dependiente de tiempo. Por lo general la información recién adquirida es lábil y se mantiene sólo a corto plazo, debido a ello es necesario el proceso de consolidación para que la memoria sea almacenada a largo plazo. Se ha descrito que el proceso de consolidación es dependiente tanto de síntesis de ARNm como de síntesis proteínica *de novo* para que éste tenga lugar (Davis y Squire 1984; Dudai y Morris 2000; McGaugh, 2000; Kandel, 2001). Con relación a lo anterior, diversos grupos de investigación han demostrado que la administración de fármacos que inhiben los procesos de transcripción y de traducción en diferentes estructuras del SNC implicadas en la estabilización de la memoria, genera un efecto amnésico sobre la información inicialmente adquirida

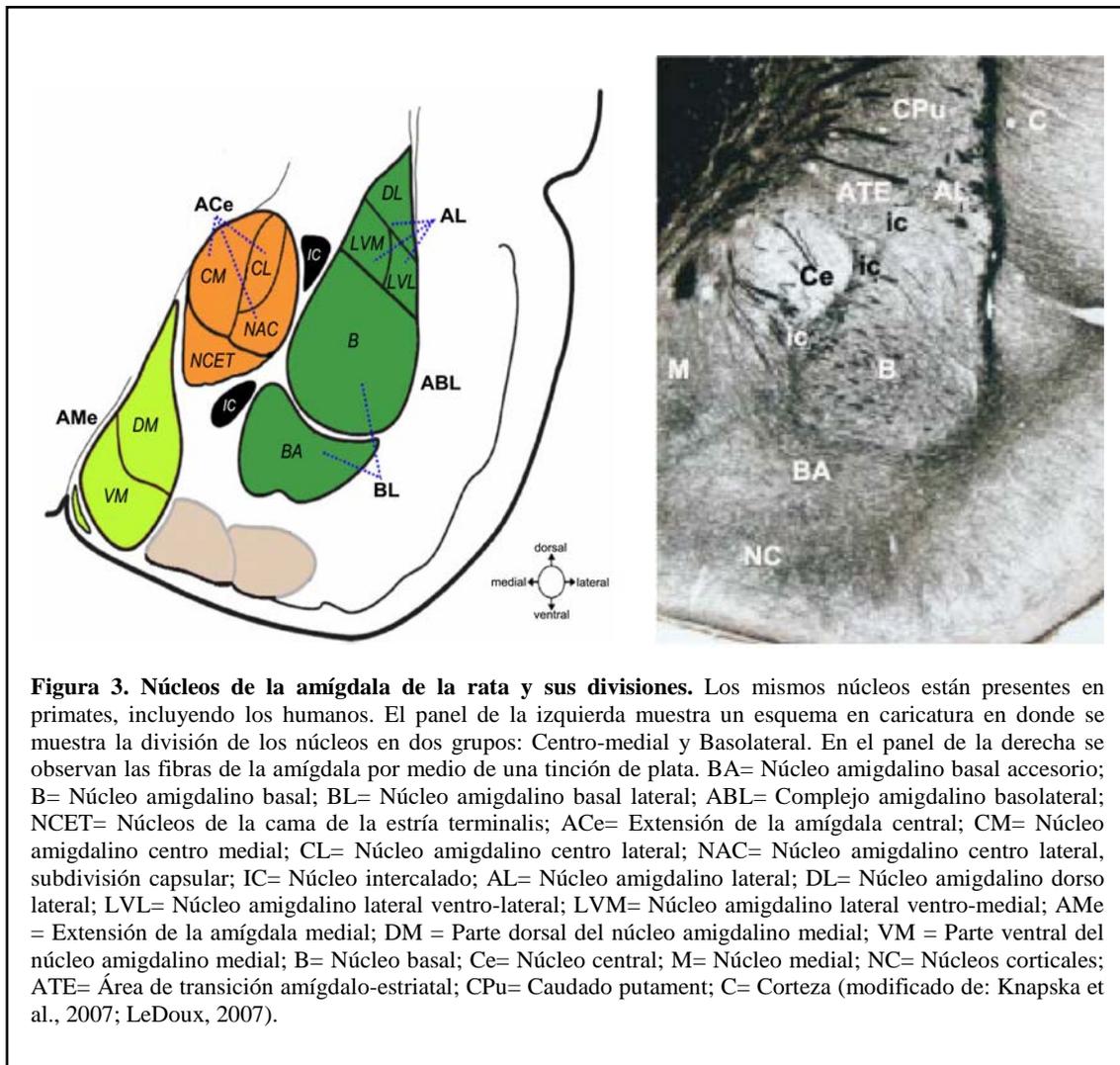
(McGaugh, 1966; Squire y Barondes, 1970; Davis y Squire, 1984; Pedreira, et al., 1996; Kandel, 2001; Barrientos et al., 2002; Igaz, et al., 2002; Dudai, 2002; Cammarota, et al., 2003; Da Silva, et al., 2008; Nader y Hardt, 2009). Así pues, la consolidación de la memoria podría verse como un diálogo entre genes y sinapsis (Kandel, 2001; citado por Morgado-Bernal, 2011). Como resultado de este diálogo ocurre una remodelación en las espinas dendríticas proporcionando cambios estructurales relativamente persistentes que favorecen la estabilización y el mantenimiento de la memoria de largo plazo. Estos cambios incluyen no sólo la formación de nuevas espinas sino también el alargamiento de la cabeza de las espinas ya formadas o bien la poda de otras espinas (Engert y Bonhoeffer, 1999; citados por Morgado-Bernal, 2011). En relación a ello, se ha indicado que el alargamiento gradual de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo es altamente dependiente de síntesis de nuevas proteínas y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés) (Tanaka et al., 2008). De hecho, el BDNF es descrito como una de las principales neurotrofinas cuya señalización contribuye con los cambios plásticos que acompañan a la consolidación de la memoria y su persistencia.

Recapitulando, el establecimiento de la memoria en el largo plazo compete modificaciones tanto estructurales, moleculares, así como de las propiedades eléctricas de las neuronas las cuales sustentan su persistencia.

2.2 EL PAPEL DE LA AMÍGDALA EN LA ESTABILIZACIÓN DE MEMORIAS AVERSIVAS

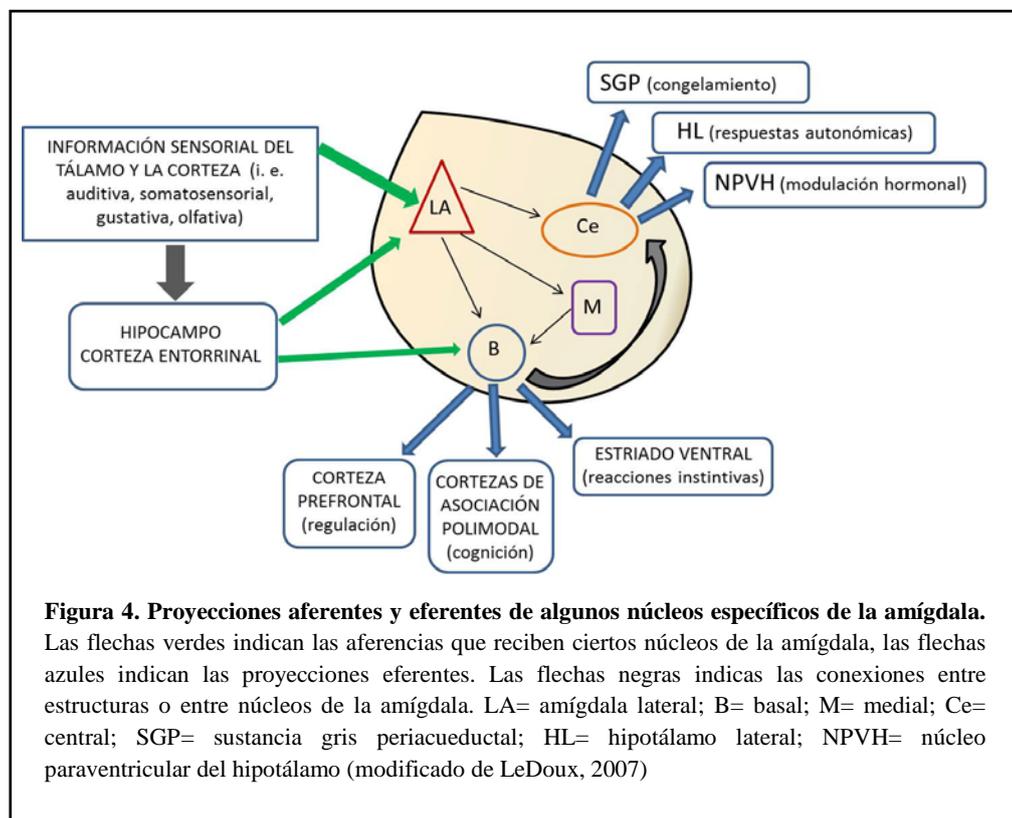
La amígdala es un complejo estructural que está implicada en un amplio rango de conductas tanto normales como patológicas. Los núcleos dentro del sistema nervioso, como es el caso de la amígdala, se distinguen por criterios histológicos, tales como la densidad, la configuración, la forma y tamaño de las células, la trayectoria de las fibras y/o con base en sus firmas químicas (LeDoux, 2007). Los núcleos de la amígdala conectan recíprocamente al hipocampo, hipotálamo y tálamo, entre otras estructuras. De esta forma, la amígdala proporciona un enlace entre el sistema sensorial y los sistemas ejecutivos de la conducta emocional en el cerebro medio y respuestas endócrinas. Los núcleos de la

amígdala se han dividido en dos grupos importantes para el estudio de aprendizajes de tipo aversivo: el basolateral, y el centromedial (Mirolli et al., 2010) (Figura 3).



En el cerebro, las conexiones entre estructuras están relacionadas a las funciones que se llevan a cabo ante una situación particular. Se ha descrito que cuando un organismo percibe un estímulo, la información sensorial (i.e., visual, auditiva, táctil, olfativa) proveniente del tálamo llega al núcleo lateral de la amígdala. Otras regiones de la amígdala reciben información de otras estructuras cerebrales, permitiendo que diversos tipos de información sean procesados por la amígdala. A partir del núcleo lateral la información es enviada a los núcleos dorsales, así como a los núcleos basolateral y medial. Posteriormente la información se conduce al núcleo central, el cual proyecta a otras estructuras como al hipotálamo lateral, al núcleo paraventricular del hipotálamo, a la sustancia gris

periacueductal, al nervio motor del vago, y a otras áreas del tallo cerebral que directamente median señales específicas de miedo y ansiedad. Sin embargo, el núcleo basal también envía proyecciones de salida hacia estructuras como la corteza prefrontal, cortezas de asociación polimodal y estriado ventral (Aggleton, 2000; LeDoux, 2007) (Figura 4). Esta capacidad favorece su proyección e intercomunicación con otras regiones del cerebro implicadas en el almacenamiento de la información. Asimismo, se ha reportado que la neurotransmisión entre el núcleo lateral y basolateral es mediada por glutamato, y que la administración de antagonistas de NMDA en el núcleo basolateral bloquea el aprendizaje en varios paradigmas de condicionamiento (Miserendino et al., 1990; Sanger y Joly, 1991; Campeau et al., 1992; Kim y McGaugh, 1992; Stefanacci et al., 1992; Liang et al., 1994; citados por Ono, Nishijo y Uwano, 1995)



Desde hace casi cinco décadas se han llevado a cabo investigaciones con diversas técnicas experimentales en diferentes especies animales, en las cuales se ha observado que la amígdala juega un papel crucial en los procesos de adquisición, consolidación y evocación de la memoria, así como en la conducta emocional y motivada (McGaugh et al., 1995; Aggleton, 2000). En este sentido, las investigaciones que reportan los efectos de la

estimulación eléctrica de la amígdala fueron los primeros en sugerir la importancia de esta estructura en estos procesos (Goodard, 1964; citado por McGaugh, 2004). Se ha mostrado, por ejemplo, que la estimulación eléctrica post entrenamiento de la amígdala puede deteriorar o incrementar la retención de la tarea, dependiendo de la intensidad del choque eléctrico empleado en el paradigma de evitación inhibitoria, sugiriendo que la amígdala está implicada en la modulación del almacenamiento de la información, la cual está a cargo selectivamente de la amígdala basolateral (BLA) (Gold et al., 1975; citado por McGaugh, Bermúdez- Rattoni y Prado-Alcalá, 1995). Por otra parte se ha reportado que la amígdala lateral (LA) participa de manera importante en la percepción y predicción de la cualidades nocivas de un estímulo, de manera que esta región en particular se ve implicada en la asociación del estímulo condicionado con el estímulo incondicionado (Blair et al., 2005).

Diversos han sido los paradigmas de memoria en donde se ha observado una participación de la activación e integridad de la amígdala para la consolidación de la información, tales como el condicionamiento de miedo al contexto, condicionamiento al miedo de clave (tono o luz), discriminación en el laberinto en Y, condicionamiento de preferencia de lugar, entrenamiento apetitivo en el laberinto radial, tarea de evitación inhibitoria, entre otros (McGaugh et al., 1988; Packard y Chen 1999; Sacchetti et al., 1999; Vazdarjanova y McGaugh 1999; Schafe y LeDoux 2000; Schroeder y Packard 2000; Hsu et al., 2002; LaLumiere et al. 2003; Miranda et al., 2003; citados por McGaugh, 2004).

Así pues, se ha descrito que la amígdala es crítica para la modulación de la memoria. Dentro de dichas influencias moduladoras en la consolidación por parte de la amígdala se encuentra la liberación de norepinefrina (NE). Por ejemplo, se ha encontrado que la estimulación con choques eléctricos produce liberación de NE en la amígdala y que la administración de epinefrina o fármacos que incrementan la consolidación (tales como antagonistas a GABA y a receptores de péptidos opioides) también incrementa la liberación de NE en la amígdala. Sin embargo, el uso de fármacos que deterioran la memoria (como agonistas a GABA y a receptores de péptidos opioides) reduce la liberación de NE (Gálvez et al., 1996; citado por McGaugh, 2000). Extensa evidencia indica que la retención de la información adquirida puede ser incrementada por la administración post entrenamiento de fármacos estimulantes del sistema nervioso, lo cual sugiere que la modulación del almacenamiento se debe a la acción de neurotransmisores endógenos y a la liberación de hormonas por la estimulación emocional (McGaugh, 1973). Al respecto, Gold y van Buskirk (1975) encontraron que la retención del entrenamiento en

evitación inhibitoria se facilitó por la administración post entrenamiento de epinefrina. Y asimismo, subsecuentes investigaciones han reportado efectos similares en experimentos en los que se emplearon diversas tareas de entrenamiento y diferentes tipos de fármacos que favorecen la liberación de vasopresina, acetilcolina, y corticoesterona (Izquierdo y Dias, 1983; McGaugh y Gold, 1989; citados por McGaugh, Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 1995). Asimismo, se ha descrito que la retención es modulada por la administración de drogas GABAérgicas. Cuando se administran agonistas GABAérgicos en la amígdala después del entrenamiento, la retención se ve deteriorada, mientras que los antagonistas GABAérgicos incrementan la retención. Por ejemplo, en ratas entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria, las lesiones en la amígdala bloquean los efectos del deterioro en la memoria producido por el fármaco diazepam administrado sistémicamente previo al entrenamiento (Tomaz et al., 1991, 1992). Esto sugiere que las influencias GABAérgicas en la memoria son mediadas por la amígdala.

En general, los estudios reportados en esta sección señalan que la amígdala juega un papel importante dentro de las diferentes fases de la memoria (adquisición, consolidación y evocación) a través de la modulación de sistemas de neurotransmisión y hormonal implicadas en la formación de la memoria. En particular, en esta investigación analizaremos la participación de la amígdala en la consolidación de la memoria aversiva evaluada en la tarea de evitación inhibitoria durante un entrenamiento incrementado.

2.3. SÍNTESIS DE ARNm Y CONSOLIDACIÓN: INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EMPLEANDO EL FÁRMACO DRB

Como ya se indicó anteriormente, numerosas evidencias experimentales indican que la consolidación es un proceso dependiente tanto de síntesis de nuevas proteínas como de ARNm *de novo* (Davis y Squire 1984; Dudai y Morris 2000; McGaugh, 2000; Kandel, 2001; Dudai y Eisenberg, 2004). No obstante, los resultados en los que se ha encontrado un estado amnésico, arrojados por estudios en los cuales se han administrado fármacos para inhibir la síntesis de proteínas *de novo* (McGaugh, 1966; Rosenblum et al., 1993; Barrietos et al., 2002 Alberini, 2008; Nader y Hardt, 2009) no son sólo el reflejo del decaimiento en la tasa de síntesis proteínica, sino que también evidencian una alteración neuroquímica y electrofisiológica en el funcionamiento neuronal. Con relación a esto, se ha encontrado que

la administración de anisomicina (fármaco inhibidor de la síntesis de proteínas) produce un aumento en los niveles de neurotransmisión (norepinefrina, dopamina, serotonina y acetilcolina) inmediatamente después de ser administrada en la amígdala e hipocampo, el cual persiste en promedio hasta por 3 horas antes de regresar a sus niveles basales (Canal et al., 2007; Qi y Gold, 2009). Por otra parte, Sharma et al., en el 2012 a través de un estudio electrofisiológico mostraron que la administración de anisomicina en el hipocampo de ratas anestesiadas suprime y/o abole la actividad espontánea y los potenciales de campo locales evocados. En este mismo estudio también se observó a través de técnicas de radio marcaje (por incorporación de aminoácidos con isótopos radioactivos) que la administración de anisomicina y cicloheximida inducen un decremento en la síntesis de proteínas, relacionado con el decremento en la actividad hipocampal.

El uso de fármacos que inhiben la síntesis de ARNm es un medio para reprimir el proceso de transcripción, uno de los procesos celulares que de manera más directa controla la expresión génica. Aunado a lo anterior y con base en los resultados que produce la utilización de inhibidores de la síntesis proteínica, el empleo de fármacos que inhiben el proceso de transcripción, es un recurso alternativo para producir un decaimiento en la tasa de síntesis de proteínas tomando en cuenta que este proceso es requerido como primera instancia para la consolidación de la memoria.

La mayoría de los genes que son expresados en una célula, son transcritos en el núcleo en una molécula llamada ARNm (ácido ribonucleico mensajero), que es transportado fuera del núcleo hacia el citoplasma, en donde se traduce hacia una proteína a través de los ribosomas. La función del ARNm es enviar la información para la fabricación de una proteína específica codificada en el ADN.

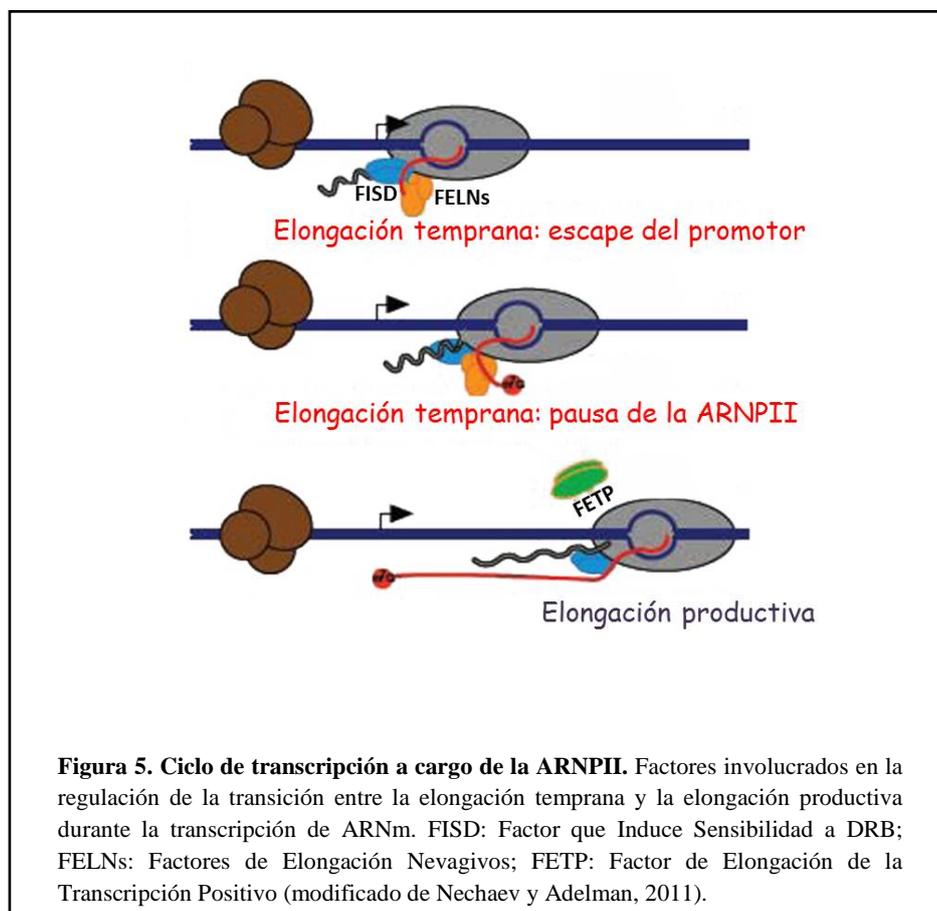
Existe gran evidencia en la literatura que muestra que la inhibición de la transcripción deteriora la consolidación de la memoria. Igaz y colaboradores demostraron que la memoria adquirida en el paradigma de evitación inhibitoria requiere de síntesis de ARNm en el hipocampo en dos ventanas de tiempo, esto es, cercano al entrenamiento y de 3 a 6 horas después del entrenamiento (Igaz et al., 2002). Asimismo, se ha reportado que la inhibición de la síntesis de ARNm en esta misma área deteriora tanto la consolidación como la re-consolidación de la memoria espacial y bloquea el restablecimiento de una respuesta al miedo previamente adquirida (Camarrota et al., 2003; Da Silva et al., 2008). Se ha observado que la síntesis de ARNm es necesaria para la consolidación de tareas

relacionadas con la amígdala como lo es el condicionamiento al miedo (Bailey et al., 1999; Schafe y Leroux, 2000; Parsons et al., 2006; citados por Duvarci et al., 2008). En este sentido, un par de estudios han reportado que la inhibición transcripcional en la amígdala deteriora la memoria al miedo auditiva y contextual de largo plazo, quedando intacta la memoria de corto plazo (Parsons et al., 2006; Duvarci et al., 2008).

Se ha descrito que el empleo de fármacos inhibidores de la transcripción, además de bloquear este proceso, incrementa la transcripción de una determinada serie de genes. Por ejemplo, se ha demostrado *in vitro* que el tratamiento a células HCT116 con DRB (5,6-Diclorobenzimidazol ribósido) a una concentración de 50 μ M, α amanitina y actinomicina D (todos ellos inhibidores de la transcripción) genera una inhibición global de la síntesis de ARNm, sin embargo se produce un aumento de la proteína p53, lo que activa la transcripción de genes blanco de p53, tales como p21 y Hdm2, promoviendo la traslocación de p53 en las mitocondrias y produciendo apoptosis (Gomes et al., 2006) Choong et al., 2009; Beckerman y Prives, 2011; citados por Bensaude, 2011). Resultados similares se han observado debido al empleo de otros fármacos que inhiben el proceso de transcripción tales como flavopiridol, α amanitina y actinomicina D (Choong et al., 2009; Beckerman y Prives, 2011; citados por Bensaude, 2011). Por otra parte, la inhibición de la transcripción también genera cambios en las propiedades bioquímicas de las proteínas nucleares, como las histonas y ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs). Con relación a lo anterior, dos investigaciones han reportado que la ubiquitinación de la histona H2B y la fosforilación de la histona H1b se reduce en células tratadas con actinomicina D o con DRB (Davie y Murphy, 1990; Chadee et al., 1997; citados por Bensaude, 2011). De manera similar, se ha demostrado que la inhibición de la transcripción resulta en una reorganización de las estructuras nucleares. En este sentido, los fármacos que inhiben la función de la ARNP II (ARN polimerasa II), como la actinomicina D, DRB o α -amanitina producen la segregación de componentes nucleolares y la formación de estructuras denominadas tapas nucleolares (Shav-Tal et al., 2005). Por otra parte, la inhibición de la ARNP III con una alta concentración de α -amanitina promueve la reorganización de un compartimento perinucleolar (Pollok y Huang, 2009)

En los estudios anteriores se han empleado diferentes tipos de fármacos inhibidores de la transcripción. Dentro de ellos, el DRB es uno de los más empleados debido a que es un

inhibidor con un mayor nivel de especificidad, ya que produce una inhibición selectiva de los transcritos para la ARNP II. Con relación a lo anterior, se ha reportado que en la mayoría de los genes los factores de elongación negativos (NELFs, por sus siglas en inglés), también conocidos como Factores que Inducen Sensibilidad al DRB (DSIF, por sus siglas en inglés) producen una pausa de la ARNP II inmediatamente después de la iniciación previniendo la continuación de la transcripción. Precisamente la fosforilación de estos factores por el Factor de Elongación de la Transcripción Postivo (P-TEFb) es requerida para sobrepasar este obstáculo. La cinasa caseína 9 (CDK9) es una sub unidad que se une con la ciclina T1 o T2 para formar un heterodímero que constituye al P-TEFb (Zandomeni et al., 1986; Peterlin y Price, 2006; citados por Nechaev y Adelman, 2011). El P-TEFb además fosforila el dominio carboxilo terminal de la subunidad larga (CTD) de la ARNP II, fase que ha sido referida como esencial para la transición de la iniciación a la elongación. De esta forma el DRB detiene la elongación de la transcripción produciendo una terminación prematura de la cadena de ARNm (Zhu et al., 1997; citado por Bensaude, 2011) (Figura 5).



Las ventajas de emplear DRB como un inhibidor de la transcripción es que su efecto es reversible, además de que, como ya se mencionó, inhibe selectivamente la ARNP II, en contraste a la actinomicina D y a la α -amanitina, las cuales afectan también la síntesis de otros ARNs (el ARN de transferencia y el ARN ribosomal), puesto que interfieren con la actividad de las ARNP I y ARNP III, este último inhibidor también afecta el nivel de traducción proteínica a altas concentraciones (Clement y Wilkinson, 2000). Por su parte, la actinomicina D también produce daño cerebral y deteriora la conducta del animal cuando se administra localmente en el cerebro (Neale et al., 1973, Rainbow 1979; citados por Igaz et al., 2002).

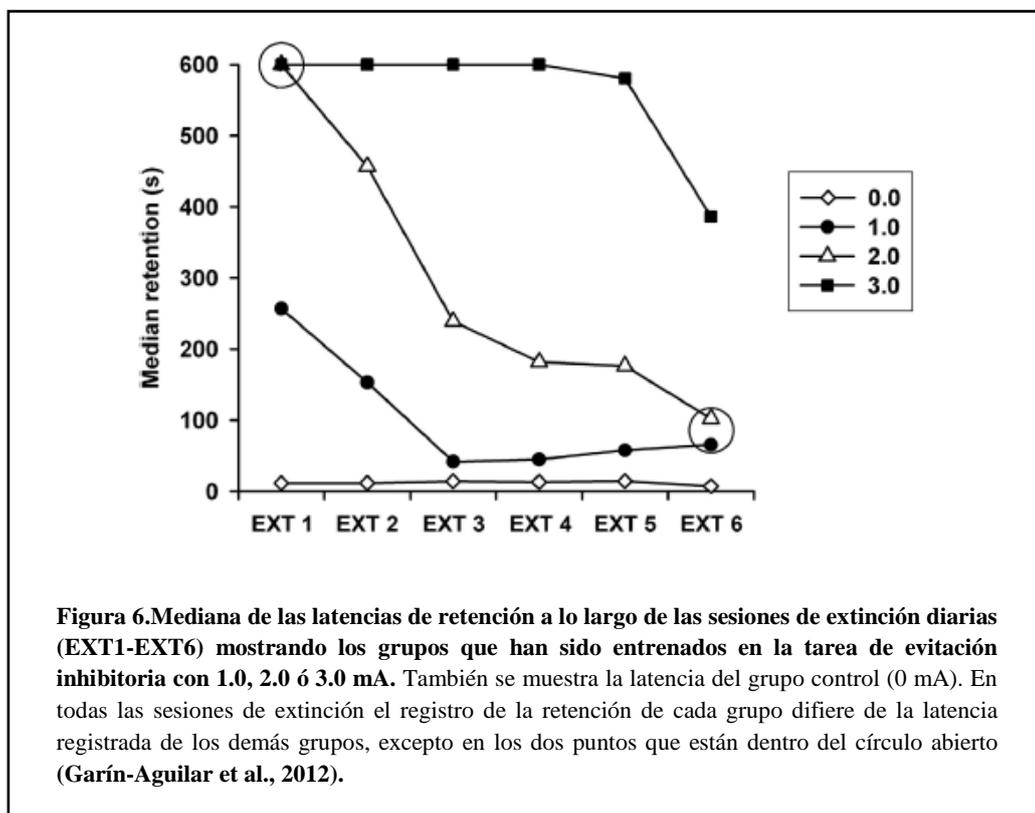
Con respecto a la reversibilidad del efecto de DRB, Nguyen y colaboradores reportaron que la aplicación de este fármaco (50 μ M) en rebanadas de hipocampo produce una inhibición de la incorporación de uridina (3 H) que revierte rápidamente entre 2 y 3 horas después (Nguyen et al., 1994; citado por Igaz et al., 2002). Con base en las propiedades del inhibidor transcripcional DRB, descritas en líneas anteriores, en el presente estudio nos enfocamos en evaluar el efecto de la inhibición de la transcripción en la amígdala empleando para tal fin la administración de DRB.

2.4 EL EFECTO PROTECTOR DEL ENTRENAMIENTO INCREMENTADO CONTRA LA AMNESIA

El entrenamiento incrementado es definido en términos operacionales como un tipo de entrenamiento en donde un sujeto es sometido a cuando menos el doble del número de sesiones de entrenamiento o de intensidades de estimulación durante el entrenamiento después de haberse alcanzado una asíntota; entendiéndose como asíntota en este caso al punto en el cual se alcanza la ejecución máxima en una tarea de memoria. Se ha demostrado que cuando un organismo es expuesto a un proceso de entrenamiento incrementado se genera un efecto protector ante la exposición a tratamientos amnésicos (Prado-Alcalá et al., 2012). Debido a que en nuestro grupo de investigación estamos interesados en comprender los efectos y los mecanismos por los cuales se llevan a cabo los efectos del entrenamiento incrementado, Garín-Aguilar y colaboradores (2012) realizaron un estudio con la finalidad de categorizar intensidades de estimulación en el paradigma de evitación inhibitoria. En este estudio, se entrenó a ratas en la tarea de evitación inhibitoria

con diferentes intensidades de choque eléctrico en las patas (1.0, 2.0 y 3.0 mA). Después del entrenamiento, los animales fueron expuestos a 6 sesiones de extinción (una sesión por día), encontrando que aquellos sujetos que fueron entrenados con intensidad de 1mA exhiben una progresiva extinción de la tarea, mientras que los grupos entrenados con intensidades de choque eléctrico de 2.0 y 3.0 mA, exhiben una fuerte resistencia a la extinción en principio, aunque en el grupo entrenado con 2.0 mA la mediana de retención se reduce hacia la sesión de extinción número 6, comportándose de forma similar con respecto al grupo entrenado con intensidad de 1.0 mA. En tanto que el grupo entrenado con intensidad de 3.0 mA preserva la resistencia a la extinción incluso hasta la sesión número 6 (Figura 6). Este estudio permitió categorizar las intensidades de choque eléctrico en la tarea de evitación inhibitoria como relativamente baja (1.0 mA) o relativamente altas (2.0 y 3.0 mA).

Por otra parte se ha demostrado que la administración sistémica de una droga anticolinérgica (que con un entrenamiento moderado ocasiona amnesia) no es capaz de generar un deterioro en la memoria cuando los animales son sometidos a una experiencia de entrenamiento incrementado mediado por una intensidad de choque eléctrico de 3.0 mA en la tarea de evitación pasiva (Durán et al. 1990).



Esta aseveración sobre la protección de un entrenamiento incrementado ante la aplicación de tratamientos que producen un déficit en la memoria ha sido explorada y confirmada a través de la administración de distintos fármacos amnésicos, como la aplicación sistémica de escopolamina (Cruz-Morales et al., 1992) y p-cloranfetamina (Solana-Figueroa et al., 2002). Asimismo se ha reportado que el efecto protector del entrenamiento incrementado persiste aún después de la inactivación de diferentes regiones cerebrales tales como el estriado (Giordano y Prado-Alcalá, 1982; Pérez-Ruiz y Prado Alcalá, 1989), el hipocampo (Quiroz et al. 2003), la sustancia nigra (Cobos-Zapíaín et al. 1996) y la amígdala (Parent et al. 1992). Con relación a lo anterior, un estudio reciente de nuestro grupo de investigación demostró que inclusive si se interfiere con la actividad de dos regiones cerebrales a la vez (cuerpo estriado + sustancia nigra, amígdala + sustancia nigra o amígdala + cuerpo estriado), se produce un efecto protector ante la amnesia cuando los animales son entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con intensidades de estimulación relativamente altas (2.0 y 3.0 mA). Particularmente la intensidad mayor (3.0 mA) es la que ocasiona el efecto protector en las 3 combinaciones de estructuras afectadas (Salado-Castillo et al., 2011).

Díaz-Trujillo y colaboradores mostraron que la administración sistémica de cicloheximida (un inhibidor de la síntesis proteínica) produce un deterioro en la retención de la memoria cuando a los sujetos se les entrena en la tarea de evitación inhibitoria con una intensidad de choque relativamente baja (0.6, 0.8 ó 1.0 mA), efecto que es revertido cuando se aplica una intensidad de choque alta (2.0, 2.4 ó 3.2 mA) (Díaz-Trujillo et al., 2009). Asimismo, un par de trabajos de nuestro grupo de investigación se reportaron que la síntesis proteínica o la síntesis de ARNm *de novo* en el hipocampo dorsal no es necesaria o suficiente para el mantenimiento de la memoria aversiva, una vez que el animal ha pasado por un proceso de entrenamiento incrementado (Rodríguez-Serrano, 2010; Torres-García, 2012).

Estas evidencias sugieren que cuando la experiencia de entrenamiento es incrementada, estas estructuras (y probablemente otras adicionales) participan en el proceso de consolidación; sin embargo, en estas circunstancias, ninguna estructura en particular es esencial para el mantenimiento de este trazo mnemónico. Posiblemente se genera una activación en paralelo de estas regiones, de tal forma que si incluso una o más de estas áreas se ven alteradas en su funcionamiento, las otras áreas reclutadas mantienen este trazo de información fuertemente adquirida (Prado-Alcalá, 1995). Asimismo, ello podría sugerir

que ante una experiencia de entrenamiento incrementado, la consolidación de la memoria a nivel de sistemas se acelera, favoreciendo el reclutamiento e interacción entre las diversas estructuras cerebrales implicadas en el mantenimiento de la información de largo plazo.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que cuando un organismo es entrenado en condiciones de entrenamiento moderado se requiere de síntesis de ARNm *de novo* en diversas estructuras cerebrales incluyendo la amígdala para que el proceso de consolidación tenga lugar. Sin embargo no se ha evaluado si en condiciones de un entrenamiento incrementado, es igualmente necesaria la síntesis de ARNm *de novo* en la amígdala para que tenga lugar el proceso de consolidación. Por ello, es importante evaluar si el efecto protector que genera el entrenamiento incrementado es dependiente de la síntesis de ARNm *de novo*, particularmente en la amígdala.

4. HIPÓTESIS

- A. La inhibición de la transcripción en la amígdala bloqueará la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria, entrenada con choques de intensidad baja (1.0 mA).
- B. La inhibición de la transcripción en la amígdala bloqueará la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria, entrenada con choques de intensidad intermedia (2.0 mA).
- C. La inhibición de la transcripción en la amígdala no afectará la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria, entrenada con choques de intensidad alta (3.0 mA).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la inhibición de la transcripción a través de la administración de DRB en la amígdala sobre la consolidación de la memoria aversiva de un entrenamiento incrementado.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar el efecto de la administración de diferentes dosis de DRB en la amígdala, (generando una curva dosis-respuesta) sobre la consolidación de la memoria aversiva, desarrollada por el entrenamiento en el paradigma de evitación inhibitoria empleando estímulos aversivos de intensidad baja (1.0).

Evaluar el efecto de la administración de la dosis amnésica óptima de DRB en la amígdala sobre la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria empleando estímulos aversivos de intensidad intermedia (2.0 mA).

Evaluar el efecto de la administración de la dosis amnésica óptima de DRB en la amígdala sobre la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria empleando estímulos aversivos de intensidad alta (3.0 mA).

6. METODOLOGÍA

6.1. SUJETOS

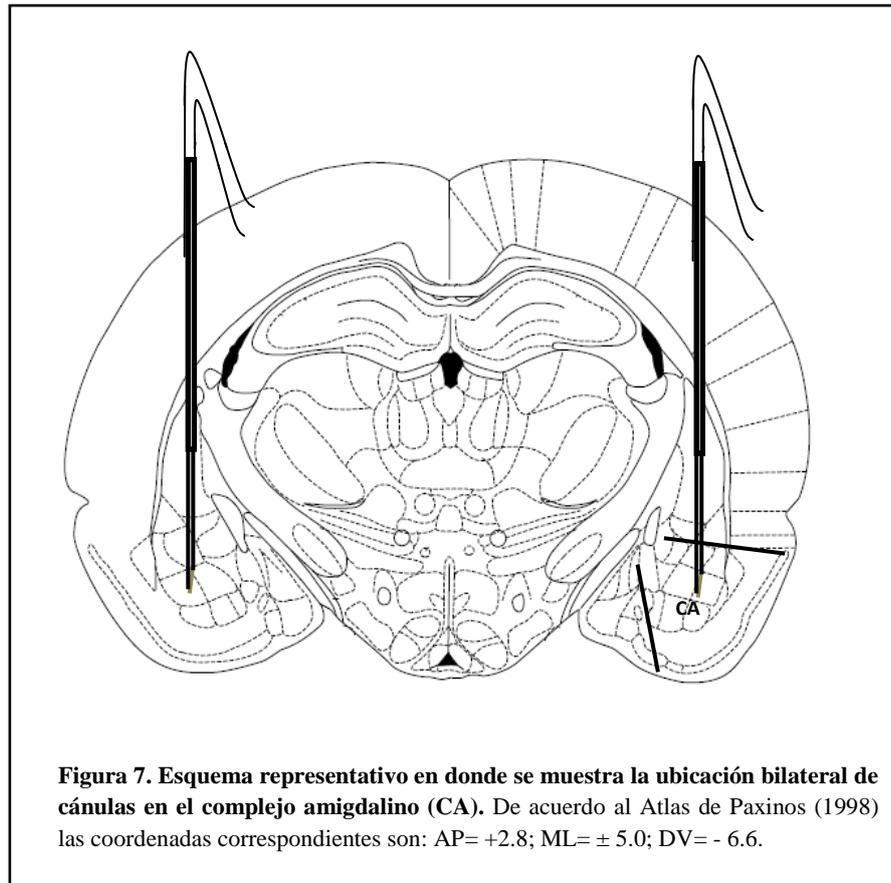
Se emplearon 93 ratas macho de la cepa Wistar de entre 250 y 350g, criadas en condiciones óptimas de bioterio y siguiendo las normas internacionales (NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals) y del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología. Se alojaron en cajas individuales con libre acceso a comida y agua, con un

ciclo luz-oscuridad de 12h (inicio a las 07:00 hrs). Se mantuvieron en estas condiciones durante todo el experimento.

6.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.2.1. Cirugía estereotáxica y administración de tratamientos

El procedimiento quirúrgico se llevó a cabo empleando las técnicas estereotáxicas convencionales y consistió en la implantación bilateral de cánulas guía de acero inoxidable de 15 mm de largo y de calibre 23, bajo el efecto del anestésico pentobarbital sódico (Nembutal) aplicado en dosis de 50 mg/ Kg de peso corporal combinado con atropina (0.4 mg/kg) por vía intraperitoneal. Las coordenadas utilizadas, según el atlas de Paxinos y Watson (1998), son: AP= +2.8; ML= \pm 5.0; DV= - 6.6, que corresponden a la amígdala (Figura 7). Para evitar la obstrucción de las cánulas, en cada una de ellas se introdujo un estilete de la misma longitud que las cánulas. Terminada la cirugía se les permitió a los sujetos recuperarse por cinco días; en los cuales se manipularon tres veces durante cinco minutos para verificar que las cánulas no se obstruyeran, para disminuir el estrés de los animales y para observar su estado de salud. Después de los cinco días se inició el procedimiento conductual. Los grupos canulados fueron inyectados bilateral e intraparenquimalmente en la amígdala. Las administraciones farmacológicas se llevaron a cabo a través de inyectores contruidos con agujas dentales de calibre 30. El inyector se introdujo en la cánula, previa remoción del estilete, extendiéndose 1 mm por debajo del extremo inferior de la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la amígdala (el mismo procedimiento se llevó a cabo en cada uno de los hemisferios). Los inyectores están conectados mediante tubos de polietileno calibre PE-20 a jeringas Hamilton con capacidad de 10 μ l. Las inyecciones del fármaco DRB y su vehículo (DMSO) fueron realizadas mediante una bomba de perfusión lenta (World Precision Instruments Inc., modelo sp200i, E.U.A.), administradas a una tasa de 0.5 μ l/min hasta alcanzar un volumen total de 0.5 μ l, dejando el microinyector dentro de la cánula durante un minuto adicional para permitir una mejor difusión. Las dosis de DRB empleadas se definirán más adelante.



6.2.2. Aparatos

La cámara de evitación inhibitoria (EI), está compuesta por dos compartimientos del mismo tamaño (30 cm x 30 cm x 30 cm) separados por una puerta tipo guillotina. Un compartimiento “de seguridad” está iluminado por un foco de 10 watts colocado en la tapadera del compartimiento y tiene una rejilla en el piso. El otro compartimiento, “de castigo”, es relativamente oscuro y sus paredes laterales de acero inoxidable tienen forma de V, las cuales llegan al piso del compartimiento, estando separadas en este lugar por una distancia de 1.5 cm (justo a la mitad del compartimiento) (Figura8). Estas láminas pueden electrificarse por un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Modelo No. S-48) acoplado a una unidad de corriente constante (Grass Modelo No.CCU-1A). La duración de la aplicación de los estímulos, las latencias de entrada y de retención fueron medidas automáticamente con ayuda de una computadora la cual permite la presentación de estímulos y el registro de las latencias de adquisición, escape y retención. La cámara de evitación inhibitoria está ubicada en un cuarto sonoamortiguado.

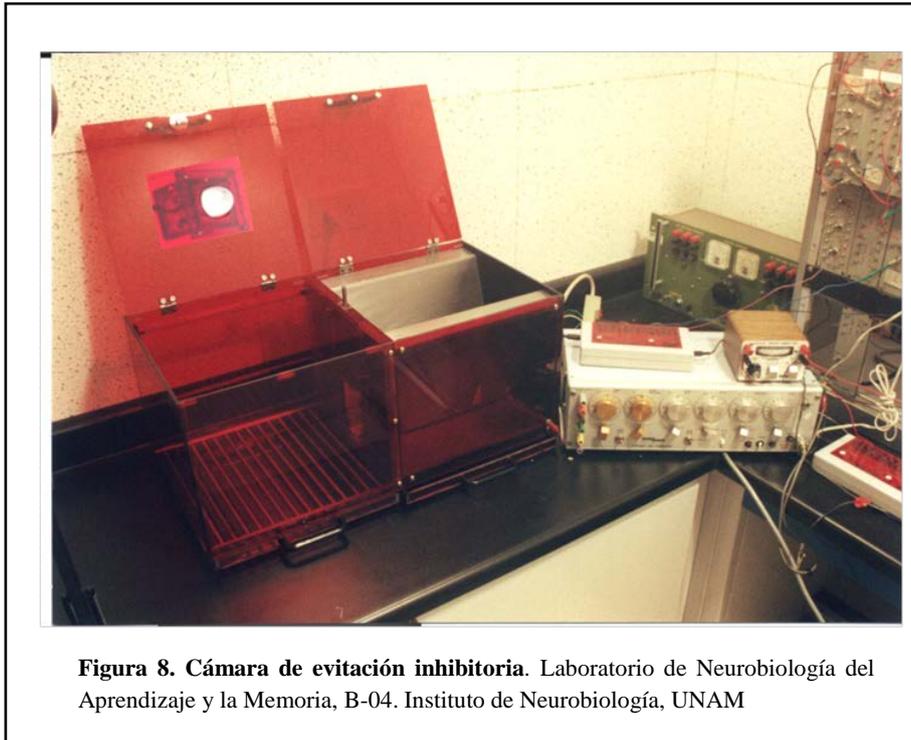


Figura 8. Cámara de evitación inhibitoria. Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, B-04. Instituto de Neurobiología, UNAM

6.2.3. Tarea conductual. Evitación inhibitoria (EI)

ENTRENAMIENTO. La rata es colocada en el compartimiento de seguridad, y 10 s después se abre la compuerta; una vez que el animal pasa al compartimiento de castigo se cierra la compuerta y se administra un choque eléctrico durante 10 s. Transcurridos 5 segundos después del inicio del choque se abre la compuerta, permitiendo a los sujetos escapar al compartimiento de seguridad en donde permanecen por 30 s antes de ser regresados a su caja-habitación. Se registra el tiempo transcurrido entre la colocación de la rata en el compartimiento seguro y el momento en el que ingresa al compartimiento de castigo (latencia de entrada), así como el tiempo en que tarda en pasar del compartimiento de castigo al de seguridad durante la administración del choque (latencia de escape).

PRUEBA DE RETENCIÓN. La medición de la retención (memoria de largo plazo) se realizó 48 h después del entrenamiento. Las condiciones de la sesión de esta prueba son similares a las descritas para la sesión de entrenamiento, con la variación de que no se administró el choque eléctrico y la sesión se dio por terminada una vez que la rata hubo pasado al compartimiento de castigo o hubieron transcurridos 600s. Se registró el tiempo transcurrido entre la apertura de la puerta y el momento en el que la rata pasó completamente al compartimiento de castigo (latencia de retención).

6.2.4. Análisis histológico

Una vez terminado el procedimiento conductual se perfundió a las ratas intracardiamente, con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 10%; se extrajeron los cerebros y se realizaron cortes coronales de 50 μm de espesor, para ser teñidos con la técnica de Nissl. Los cortes se observaron con un microscopio para determinar si las puntas de los inyectores estuvieron alojadas en la amígdala, y poder descartar del experimento a las ratas que no fueron implantadas correctamente. En virtud de que las hipótesis se refieren a los efectos de la administración de sustancias en la amígdala en general, para los análisis estadísticos se tomaron en consideración todos los sujetos que tuvieron las puntas de los inyectores dentro del complejo amigdalino en ambos hemisferios, independientemente de la zona o núcleo en la que quedaron las puntas de los inyectores (Figura 9).

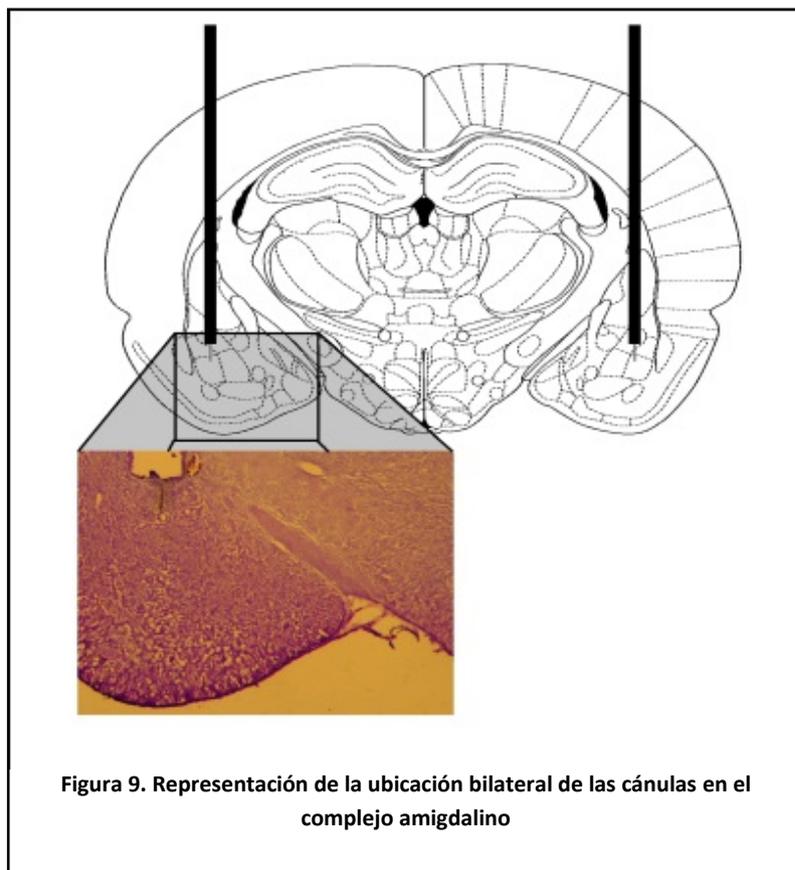
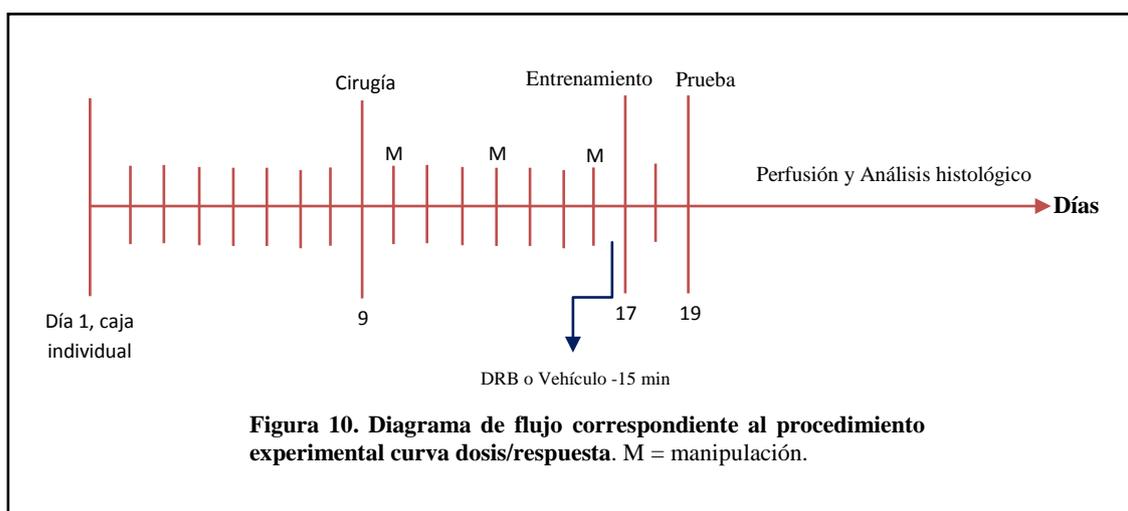


Figura 9. Representación de la ubicación bilateral de las cánulas en el complejo amigdalino

6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.3.1. FASE 1. Curva dosis/respuesta

Con la finalidad de realizar una curva dosis/respuesta para encontrar aquella dosis con la cual el DRB produjera un efecto amnésico en la consolidación de la tarea de EI, los animales fueron asignados a diferentes grupos de acuerdo a la dosis de DRB que fue suministrada (20, 40 ó 80 ng/ μ l). Adicionalmente, a un cuarto grupo se le administró DMSO (Dimetil Sulfoxido) como vehículo de DRB. Las inyecciones intra amígdala se llevaron a cabo 15 min antes del entrenamiento de EI, en donde la intensidad del choque aplicada fue relativamente baja (1 mA) (Figura 10 y Tabla 1).

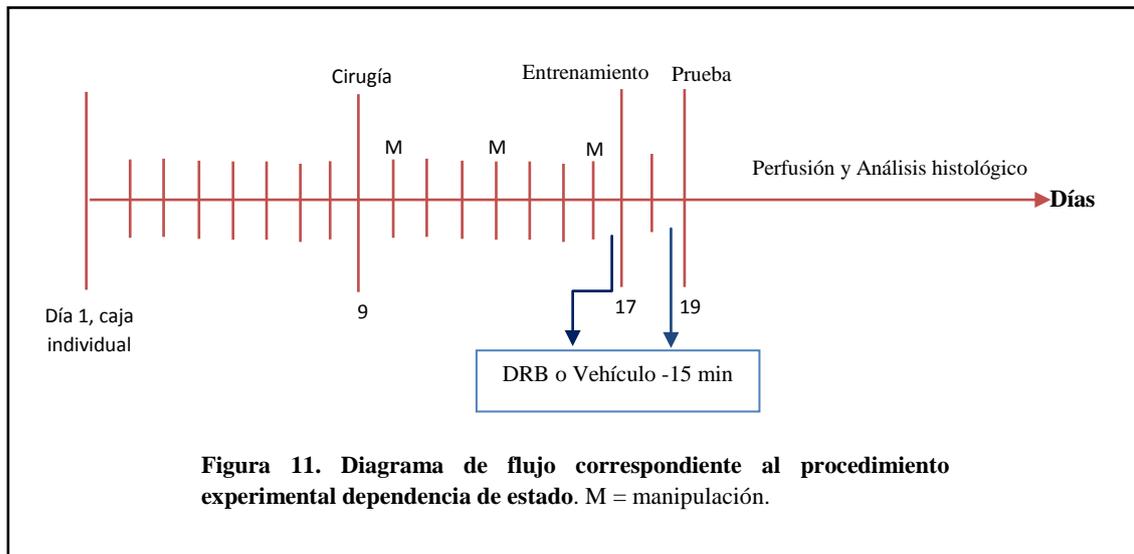


Intensidad del choque	1 mA			
Dosis (ng/0.5 μ l/hemisferio)	Vehículo (DMSO)	DRB		
		20 ng	40 ng	80 ng

Tabla 1. Asignación de grupos. Tratamientos aplicados a los cuatro grupos que fueron entrenados con una intensidad de 1.0 mA

6.3.2. Dependencia de estado

Debido a que los tratamientos fueron administrados 15 minutos antes del entrenamiento, los sujetos se encontraban bajo el efecto de la droga durante la adquisición de la tarea; sin embargo, durante la prueba de retención (48 horas después) el efecto de la droga ya se había revertido (Nguyen et al., 1994; citado por Igaz et al., 2002). Ante esta situación podría ocurrir un fenómeno de dependencia de estado, esto es, una forma peculiar de aprendizaje en la que la información que ha sido aprendida mientras el animal se encuentra bajo la influencia de una cierta droga (estado) puede ser recordada y usada para resolver una tarea sólo cuando el animal se encuentra en el mismo estado en el cual la información fue aprendida, pero no en un estado diferente, por ejemplo cuando no está bajo la influencia del fármaco. Para determinar si este es el caso, se entrenaron dos grupos independientes de ratas en la tarea de EI con intensidad de 1.0 mA. Se administró vehículo o DRB (80 ng/ μ l) tanto 15 minutos antes del entrenamiento como 15 minutos antes de la prueba de retención a las 48 h (Figura 11 y Tabla 2).

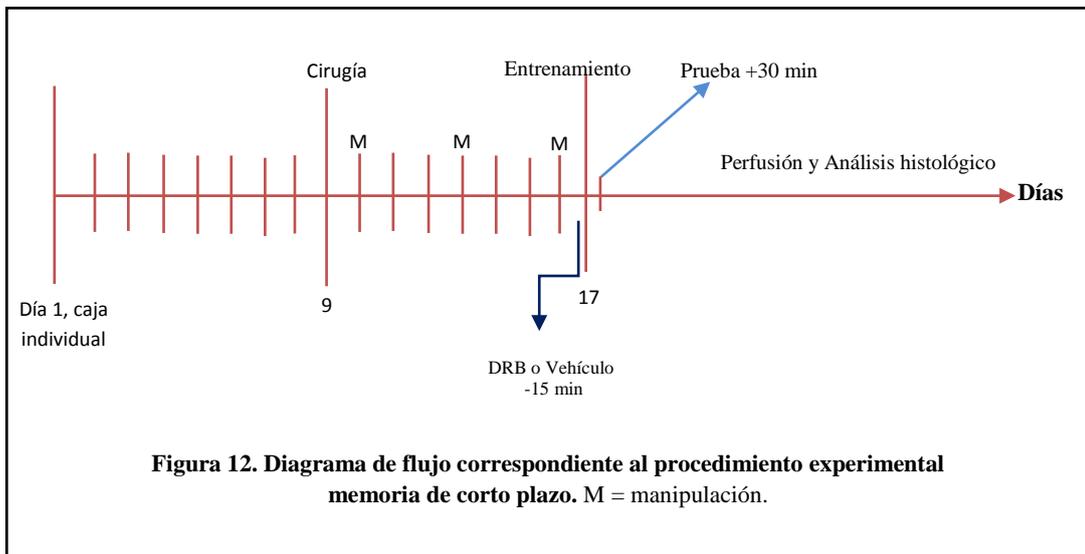


Intensidad del choque	1 mA	
Dosis (ng/0.5 μ l/hemisferio)	Vehículo (DSMO)	DRB 80 ng

Tabla 2. Asignación de grupos. Tratamientos aplicados a los dos grupos que fueron entrenados con una intensidad de 1.0 mA

6.3.3. Memoria de corto plazo

Con la finalidad de evaluar si los efectos del fármaco DRB administrado antes del entrenamiento interfieren con la consolidación de la memoria o con el aprendizaje, se administró DRB (80 ng/ μ l) o vehículo a grupos de ratas independientes y 15 minutos después se les entrenó en la tarea de evitación inhibitoria con intensidad de 1mA. Posteriormente se llevó a cabo la prueba de retención 30 minutos después del entrenamiento para evaluar la memoria de corto plazo (MCP). Deterioros de la MCP sugerirían un deterioro en el aprendizaje. La ausencia de deterioros en la MCP sugeriría que las posibles deficiencias en la retención a las 48 hrs (memoria de largo plazo, MLP) se explican mejor como una interferencia con la consolidación de la memoria (Figura 12 y Tabla 3).

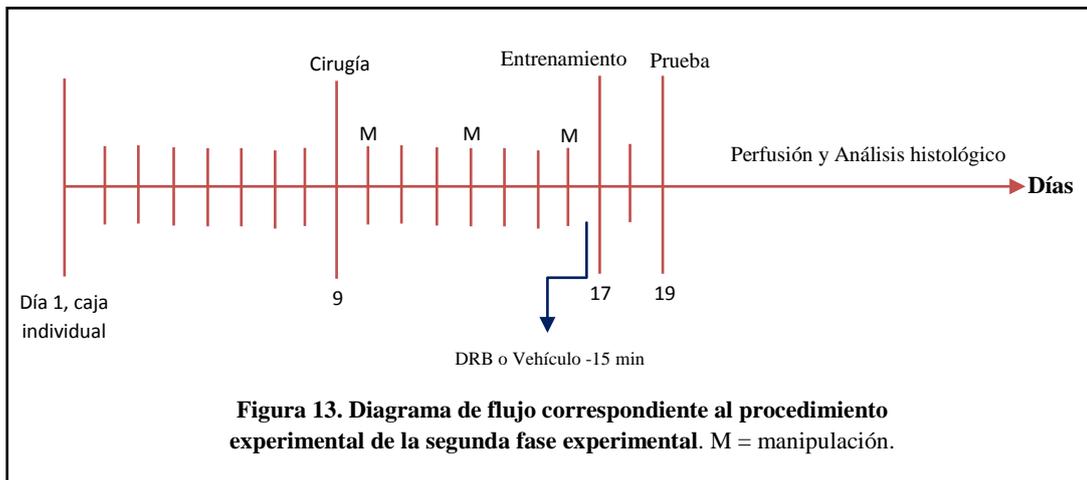


Intensidad del choque	1 mA	
Dosis	Vehículo	DRB
(ng/0.5 μ l/hemisferio)	(DSMO)	80 ng

Tabla 3. Asignación de grupos. Administración farmacológica de DRB (80 ng) o vehículo (DMSO).

6.3.4 FASE 2. Efecto del entrenamiento con intensidades de estimulación aversiva intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA)

Con la finalidad de evaluar si el entrenamiento incrementado (generado por el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria con una intensidad relativamente alta) produce un efecto protector contra el efecto amnésico de un fármaco inhibidor de la transcripción en la amígdala, se administró DRB (80 ng) o vehículo en la amígdala a grupos de ratas independientes 15 minutos antes de ser entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con una intensidad de choque intermedio (2.0 mA). Asimismo, se evaluó el efecto del entrenamiento con una intensidad alta (3.0 mA). Los parámetros de estimulación fueron establecidos con base a la curva de extinción de Garín-Aguilar et al., 2012. (Figura 13 y Tabla 4).



Intensidad del choque	2 mA	3 mA
Dosis (ng/0.5µl/hemisferio)	Vehículo (DMSO)	Vehículo (DMSO)
	DRB 80 ng	DRB 80 ng

Tabla 4. Asignación de grupos. Administración farmacológica de los cuatro grupos independientes que fueron entrenados con intensidades de choque intermedio (2.0 mA) o alto (3.0 mA).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

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

8. RESULTADOS

8.1. FASE I. Curva dosis/respuesta

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las latencias de entrada y las latencias de escape entre los grupos experimentales que fueron inyectados con diferentes dosis de DBR y el grupo control al cual se le administró DMSO (Figura 14).

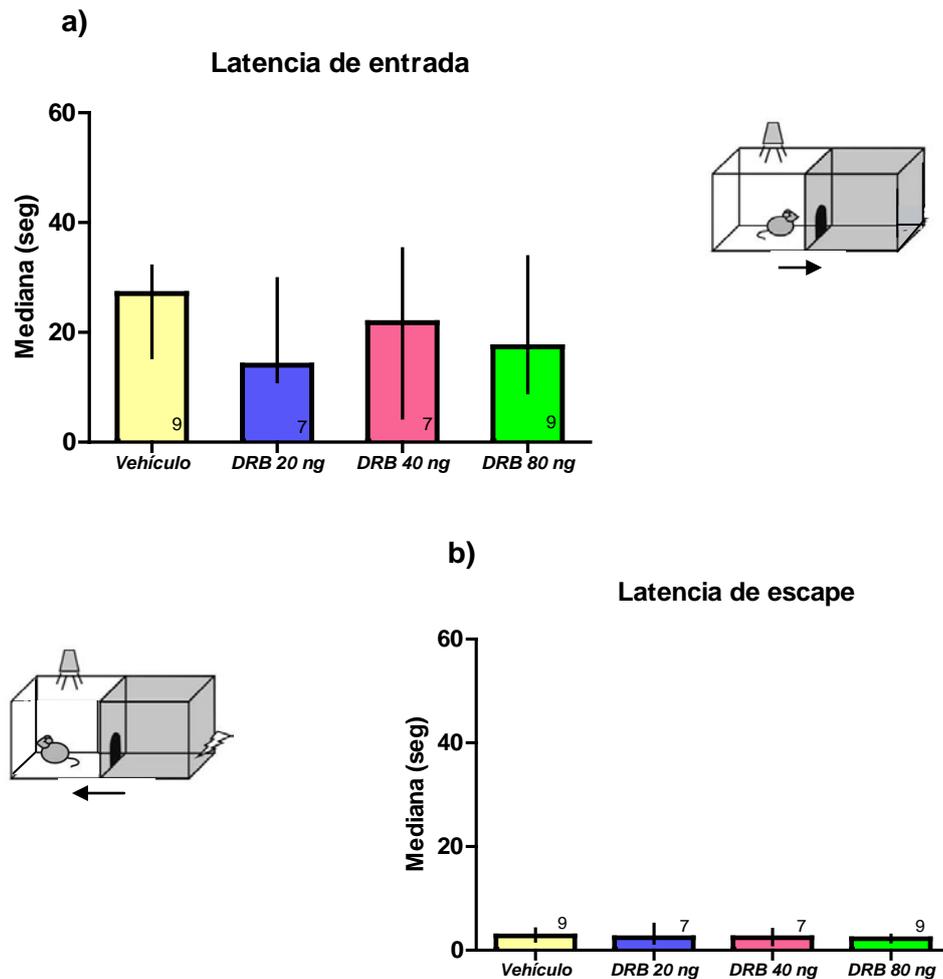


Figura 14. a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos. Medianas con rangos intercuartiles para cada uno de los grupos independientes a los cuales se les administró: DBR (20, 40 u 80 ng/0.5 μ l/hemisferio), o Vehículo. En cada barra se muestra el número de sujetos por grupo. Los animales fueron entrenados con una intensidad de 1.0 mA.

Sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas respecto a la latencia de retención entre los grupos experimental y control ($H(3) = 12.09, p = 0.0071$). Una vez que se utilizó la prueba post-hoc U de Mann-Whitney para comparar la ejecución entre pares de grupos, los resultados arrojaron diferencias significativas entre el grupo vehículo con respecto a los grupos DRB 40 ng y DRB 80 ng ($p = 0.0104$ y $p = 0.0034$ respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo vehículo y el grupo DRB 20 ng, ni entre los grupos DRB 40 ng y 80 ng (Figura 15).

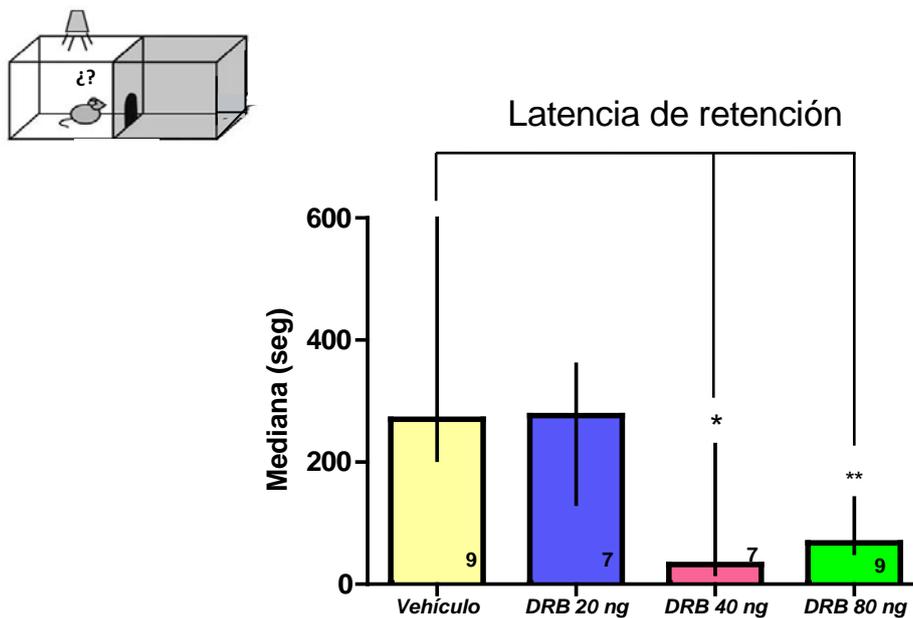


Figura 15. Latencia de retención en segundos. Medianas con rangos intercuartiles para cada uno de los grupos independientes a los cuales se les administró: DRB (20, 40 u 80 ng), o vehículo. Las ratas fueron entrenadas con una intensidad de 1.0 mA. En cada barra se muestra el número de sujetos para cada grupo. Se observan diferencias significativas de los grupos DRB 40 ng y DRB 80 ng con respecto al grupo Vehículo * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respectivamente.

8.1.1. Dependencia de estado

En este experimento no se observaron diferencias significativas en cuanto a las latencias de entrada y las latencias de escape entre los grupos a los cuales se les entrenó con una intensidad de choque relativamente baja y se les administró DRB (80 ng) o vehículo (DMSO) 15 minutos antes del entrenamiento (1.0 mA de choque eléctrico) y posteriormente 15 minutos antes de la prueba de retención (Figura 16).

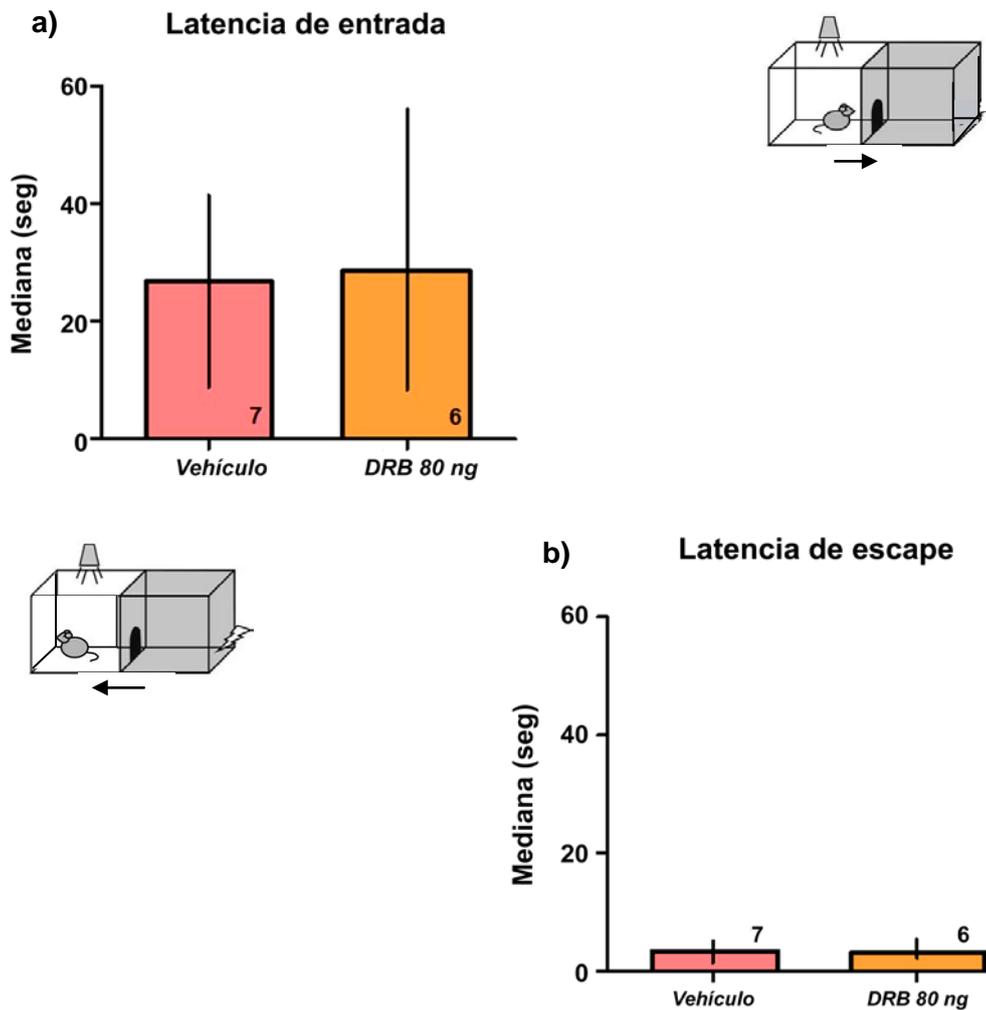


Figura 16. a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos. Medianas con rangos intercuartiles para cada uno de los grupos independientes a los cuales se les administró: DRB (80 ng/0.5 μ l/hemisferio), o Vehículo 15 minutos antes del entrenamiento y posteriormente 15 minutos antes de la prueba de retención. En cada barra se muestra el número de sujetos por grupo. Los animales fueron entrenados con una intensidad de 1.0 mA.

Sin embargo, los datos arrojados por la prueba U de Mann-Whitney muestran que hay diferencias significativas respecto a la latencia de retención entre el grupo control (DMSO) y el grupo experimental (DRB 80 ng) ($U= 6.0$, $p=0.035$), los cuales recibieron el tratamiento farmacológico 15 minutos antes del entrenamiento (1.0 mA de choque eléctrico) y 15 minutos antes de la prueba de retención (Figura 17).

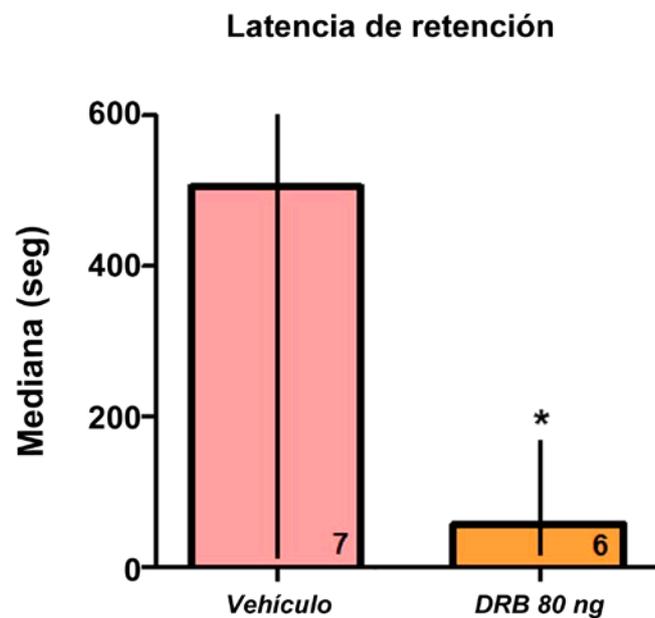
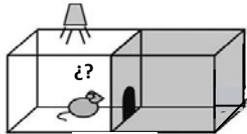


Figura 17. Latencia de retención en segundos. Medianas con rangos intercuartiles para el par de grupos independientes a los cuales se les administró Vehículo (DMSO) o DRB (80 ng) tanto 15 minutos antes del entrenamiento como 15 minutos antes de la prueba de retención. Se observan diferencias significativas del grupo DRB 80 ng con respecto al Vehículo * $p < 0.05$.

8.1.2. Memoria de corto plazo

Con respecto a la medición de la latencia de entrada y escape en los grupos control (DMSO) y experimental (DRB 80 ng/ μ l), a los que se evaluó la memoria de corto plazo 30 minutos después del entrenamiento (los cuales fueron entrenados con intensidad de 1.0 mA), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 18).

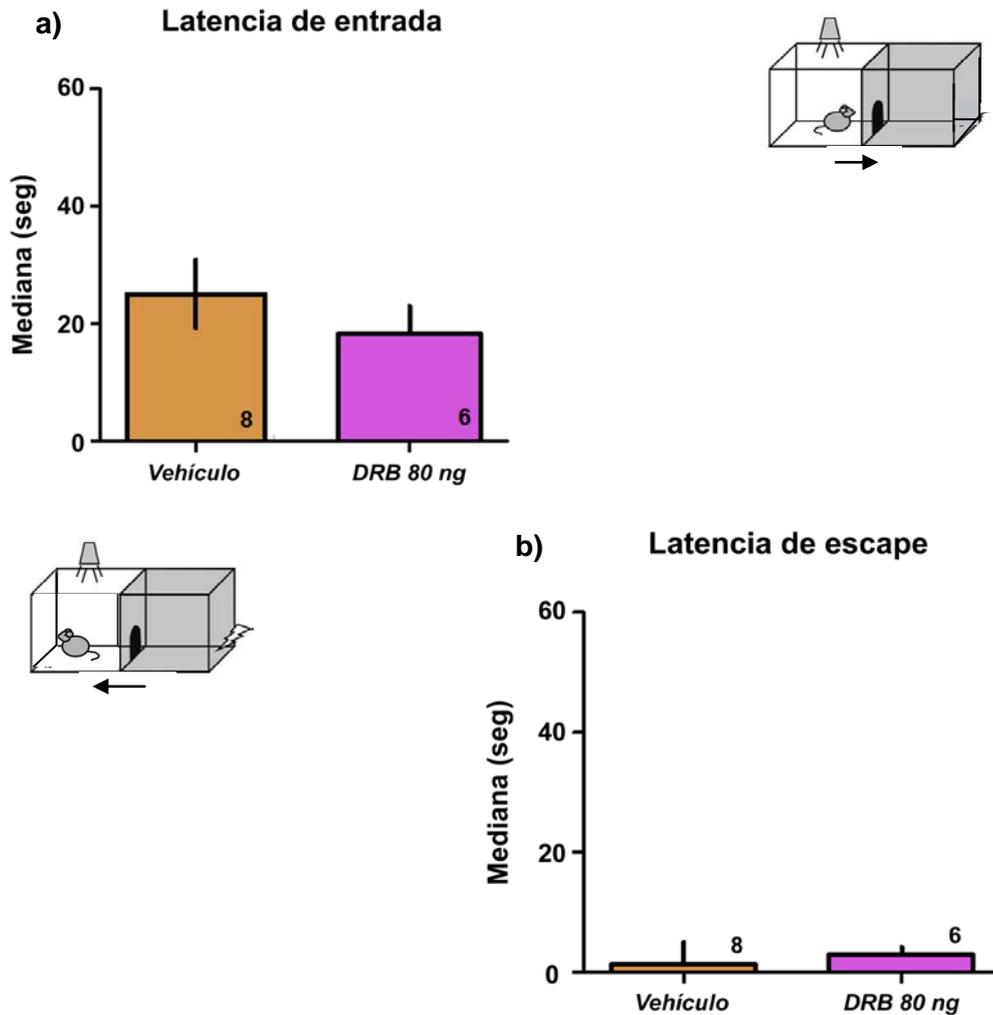


Figura 18. a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos. Medianas con rangos intercuartiles para cada uno de los grupos independientes a los cuales se les administró: DRB (80 ng/0.5 μ l/hemisferio), o Vehículo. Los animales fueron entrenados con una intensidad de 1.0 mA. La prueba de memoria de corto plazo se midió 30 minutos después del entrenamiento. En cada barra se muestra el número de sujetos por grupo.

En cuanto a la latencia de retención, la prueba *U de Mann-Whitney* muestra que no hay diferencias significativas en cuanto a la memoria de corto plazo (MCP) entre los grupos control (DMSO) y experimental (DRB 80 ng), la cual fue evaluada 30 minutos después del entrenamiento. Sin embargo, cuando se evaluó la memoria 48 horas después (memoria de largo plazo, MLP), se observan diferencias significativas entre los grupos Vehículo y DRB 80 ng ($U= 6.59, p= 0.01$) (Figura 19).

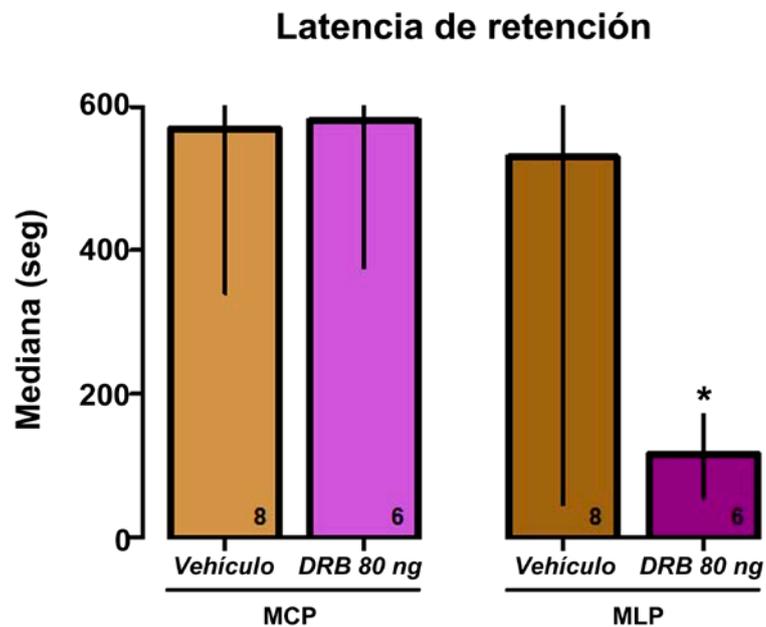
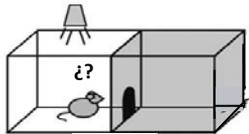


Figura 19. Latencias de retención en segundos de la memoria de corto plazo (MCP) y de la memoria de largo plazo (MLP). Medianas con rangos intercuartiles para cada uno de los grupos a los cuales se les administró: DRB (80 ng), o vehículo (DMSO). La MCP se evaluó 30 minutos después del entrenamiento y la MLP se midió 48 horas después del entrenamiento. Se observan diferencias significativas entre los grupos Vehículo y DRB en la MLP * $p < 0.05$.

8.2. FASE II. Efecto del entrenamiento con intensidades de estimulación aversiva intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA)

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la latencia de entrada y la latencia de escape entre los grupos experimentales (DRB 80 ng) y los grupos control (DMSO como vehículo), los cuales fueron entrenados con intensidad de estimulación intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA) (Figura 20).

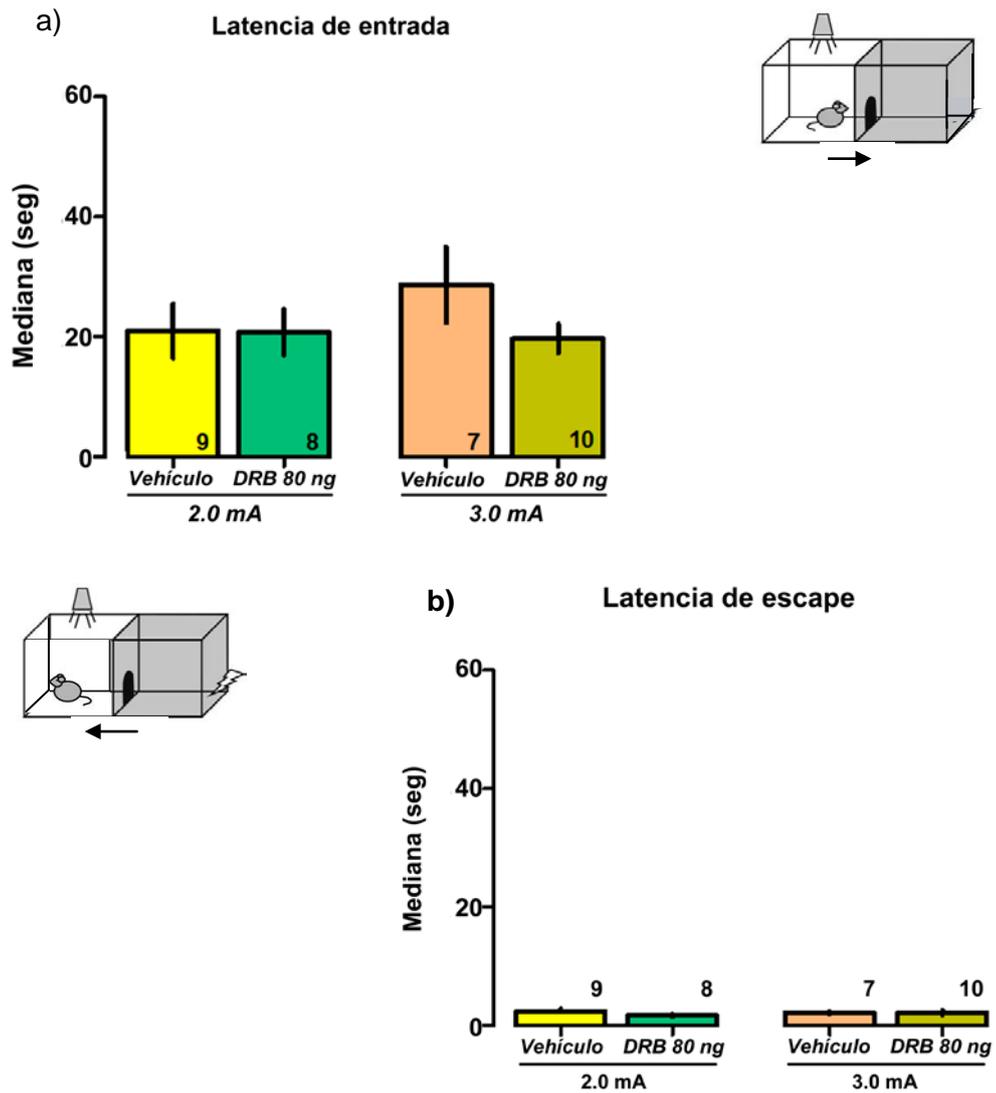
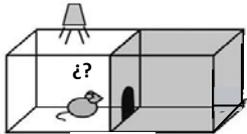


Figura 20. a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos. Medianas con rangos intercuartiles para cada uno de los grupos independientes a los cuales se les administró: DRB (80 ng/0.5 μ l/hemisferio), o Vehículo. Los animales fueron entrenados con una intensidad intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA). En cada barra se muestra el número de sujetos por grupo.

Al evaluar la latencia de retención entre los animales que fueron entrenados con una intensidad intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA), no se encontraron diferencias significativas en cuanto a sus respectivos grupos Vehículo. Adicionalmente, para fines de comparación se agregó a la gráfica la latencia de retención de los grupos experimental (DRB 80 ng) y control (Vehículo) que fueron entrenados con intensidad de 1 mA. (Figura 21).



Latencia de retención

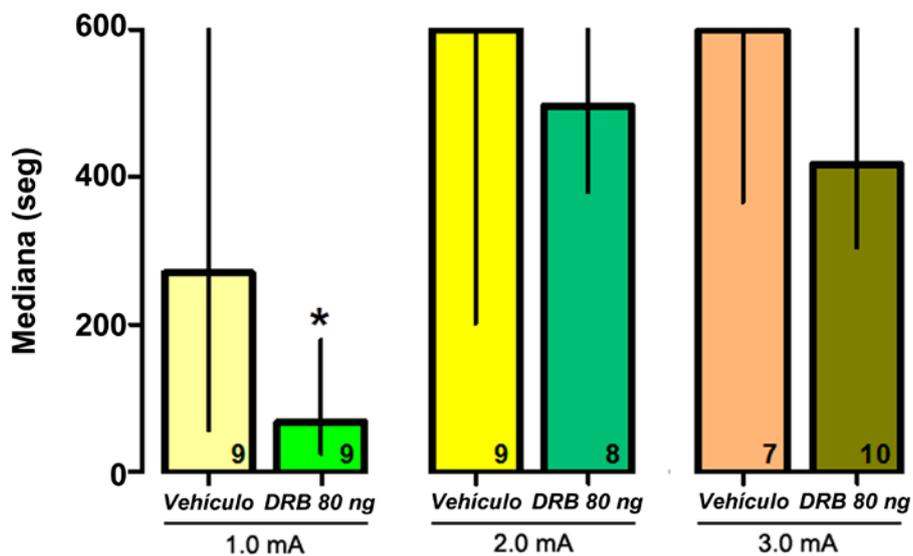


Figura 21. Latencia de retención en segundos. Medianas con rangos intercuantiles para los grupos que fueron entrenados con intensidades de choque baja (1.0 mA), intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA). Se observan diferencias significativas entre el grupo DRB 80 ng con respecto a su Vehículo entrenados con intensidad de 1.0 mA, * $p < 0.05$.

Adicionalmente, se analizó de manera independiente la ejecución durante la **prueba de retención de largo plazo** entre los grupos vehículo entrenados con las tres diferentes intensidades (1.0, 2.0 y 3.0 mA) y entre los grupos tratados con DRB (80 ng/0.5 μ l) entrenados con las tres diferentes intensidades (1.0, 2.0 y 3.0 mA). Ello principalmente para evaluar si había diferencias significativas en la prueba de retención entre los grupos vehículo, ya que la gráfica anterior sugiere que la retención del grupo vehículo entrenado con intensidad baja (1.0 mA) es menor en comparación a los grupos vehículo entrenados con intensidades intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA). Sin embargo, la prueba estadística *Kruskal-Wallis* muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos vehículo entrenados con 1.0, 2.0 ó 3.0 mA. Mientras que el análisis estadístico entre los grupos tratados con DRB (80 ng/0.5 μ l) y entrenados con las tres diferentes intensidades (1.0, 2.0 ó 3.0 mA) muestra diferencias significativas ($H(3) = 17.35, p = 0.0002$). La prueba post hoc de *Dunns* de comparaciones múltiples muestra que hay diferencias significativas entre el grupo DRB 1.0 mA respecto a los grupos DRB 2.0 mA y DRB 3.0 mA ($p < 0.05$) (Figura 22).

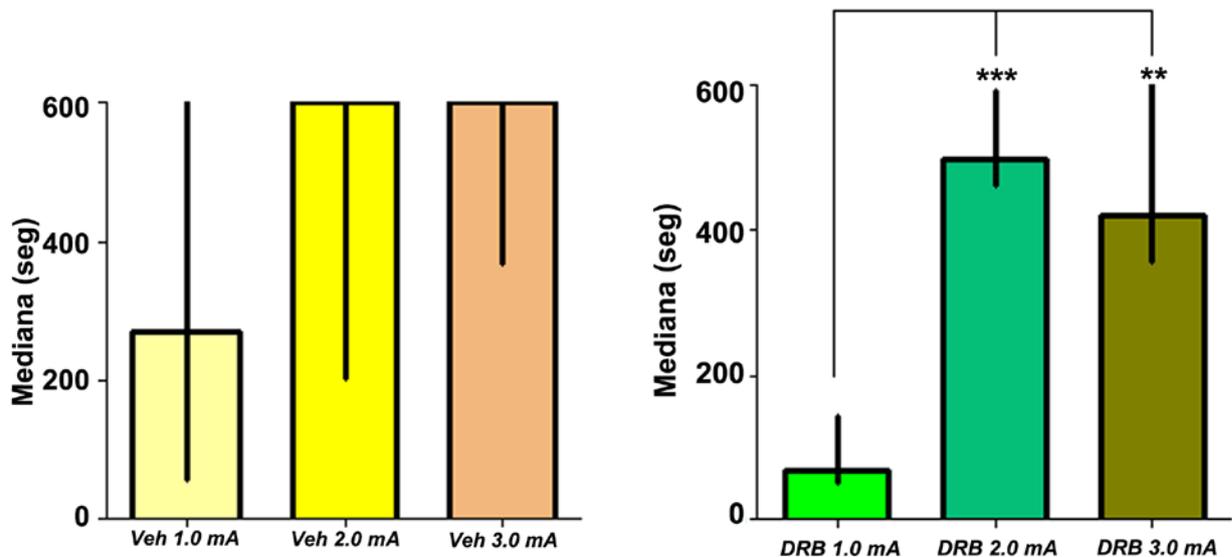


Figura 22. Latencia de retención en segundos. Izquierda: medianas con rangos intercuartiles entre los grupos vehículo que fueron entrenados con intensidades de choque baja (1.0 mA), intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA). Derecha: medianas con rangos intercuartiles entre los grupos tratados con DRB (80 ng/0.5 μ l/hemisferio) que fueron entrenados con intensidades de choque baja (1.0 mA), intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA). Derecha: se observan diferencias significativas entre el grupo DRB 1.0 mA con respecto a los grupos DRB 2.0 mA y DRB 3.0 mA ** $p < 0.01$, *** $p = 0.0002$.

9. DISCUSIÓN

Dentro de las neurociencias se han generado una serie de dogmas que se han mantenido durante mucho tiempo debido a que ha existido una vasta serie de experimentos que los apoyan, o bien porque no se contaba con la tecnología adecuada para poder interpretar adecuadamente los hallazgos. Sólo por mencionar un par de ellos, hasta antes de la década de 1960 se pensaba que las neuronas adultas no podían incrementar en tamaño ni establecer nuevos contactos sinápticos, esto a pesar de que Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XIX ya había planteado la idea visionaria de lo que él denominó “Gimnasia cerebral”, entendido como la probabilidad a modificar el aparato dendrítico y las colaterales del axón de las áreas del cerebro más relacionadas con el ejercicio mental; las asociaciones entre los conjuntos de neuronas serían reforzadas con el aprendizaje y el aprendizaje se expresaría en forma de cambios anatómicos a nivel de las neuronas (Cajal, 1899). Otro de los dogmas mantenido desde finales del siglo XIX (inicios de la neurociencia moderna) hasta ya avanzada la segunda mitad del siglo XX, fue que las células del SNC en mamíferos permanecían estructuralmente estables desde el nacimiento a lo largo de toda la vida. La neurogénesis (producción de nuevas neuronas) fue descrita por primera vez por Altman (1962, 1963, 1966, 1967, 1969), quien a utilizando de la técnica de auto-radiografía por incorporación de ^3H -timidina (la cual es tomada por células que están sintetizando ADN en la preparación para la mitosis) reportó la presencia de nuevas neuronas en una variedad de estructuras del cerebro de rata y gato adultos incluyendo el bulbo olfatorio, el hipocampo y la corteza cerebral. Quince años después, Kaplan examinó la ultraestructura de las células marcadas con ^3H -timidina en el bulbo olfatorio, el hipocampo y la neocorteza, confirmando que se trataba de neuronas (Kaplan y Hinds, 1977; Kaplan, 1981, 1985; Kaplan y Bell, 1984; citados por Gould y Gross, 2002). Sin embargo los trabajos pioneros de estos investigadores fueron recibidos con escepticismo y tuvieron poco impacto en el campo en estas fechas.

En esta mismo orden de ideas, las hipótesis que ha sido fuertemente apoyada en el ámbito de la consolidación de la memoria son en torno a que: a) la consolidación es un proceso que toma tiempo para que se establezca, b) durante el cual la memoria es susceptible de ser alterada y c) que es dependiente tanto de síntesis de nuevas proteínas como de ARNm *de*

novo. Estas hipótesis han sido apoyadas por estudios en donde se han aplicado fármacos o tratamientos amnésicos cercanos al entrenamiento mostrándose una alteración en la consolidación (Davis y Squire 1984; Müller y Pilzecker, 1900; Dudai y Morris 2000; McGaugh, 2000; Kandel, 2001; Dudai y Eisenberg, 2004). Sin embargo, hay que recordar que los resultados obtenidos por estudios farmacológicos en donde para producir amnesia se emplean inhibidores de síntesis de proteínas como la anisomicina (McGaugh, 1966; Rosenblum et al., 1993; Barrietos et al., 2002 Alberini, 2008; Nader y Hardt, 2009), no son sólo el reflejo del decaimiento en la tasa de síntesis proteínica, sino que también evidencian una alteración neuroquímica (Canal et al., 2007; Qi y Gold, 2009) y electrofisiológica en el funcionamiento neuronal (Sharma et al., en el 2012).

Con relación a lo anterior, en el presente estudio optamos por emplear un fármaco inhibidor del ARNm *de novo* como tratamiento farmacológico amnésico debido a que ha sido demostrado ampliamente que los fármacos inhibidores de la fase de transcripción interfieren con la consolidación debido a que afectan la expresión génica de genes implicados en la consolidación y reducen la tasa de producción de síntesis de proteínas en diferentes estructuras cerebrales incluida la amígdala (Bailey et al., 1999; Schafe y LeDoux, 2000; Igaz et al., 2002; Cammarota et al., 2003; Parsons et al., 2006; Da Silva et al., 2008; Duvarci et al., 2008). Decidimos emplear como fármaco inhibidor de la transcripción al DRB debido a que su efecto es reversible e inhibe selectivamente la ARNP II, con lo que nos aseguramos que se vea afectada la transcripción de ARNm y no del ARNr o delARNt como se ha visto con otros fármacos (Clement y Wilkinson, 2000).

Los experimentos realizados en la primera parte de nuestro trabajo, muestran que la consolidación de una memoria aversiva bajo condiciones normales de entrenamiento (1.0 mA de choque eléctrico) se ve afectada por la administración intra-amigdalina de DRB, el cual interfiere con la producción de ARNm en forma madura (Bensaude, 2011; Nechaev y Adelman, 2011). Particularmente observamos que la administración de DRB produce un deterioro únicamente de la memoria de largo plazo, ya que la memoria de corto plazo queda intacta. Con base en esto inferimos que la síntesis de ARNm es importante para que el proceso de consolidación tenga lugar, y que la memoria de corto plazo puede prescindir de la transcripción para su mantenimiento (Parsons et al., 2006).

Por otra parte, contrario a las hipótesis convencionales acerca de la consolidación, ha surgido otra serie de estudios en donde se ha propuesto que la consolidación,

particularmente cuando se produce debido a una experiencia fuertemente emotiva, no es dependiente de síntesis de proteínas y tampoco de ARNm *de novo*. En relación a esto se ha demostrado que cuando un organismo es expuesto a un proceso de entrenamiento incrementado (una situación en la cual un sujeto recibe más sesiones de entrenamiento después de haberse alcanzado una asíntota, o es entrenado con intensidades de estimulación aversiva relativamente altas), se genera un efecto protector ante la exposición a tratamientos amnésicos. Esta hipótesis del efecto protector ante tratamientos amnésicos provocado por el entrenamiento incrementado se ha demostrado tanto por administración sistémica de fármacos que afectan la consolidación (Durán et al. 1990; Cruz-Morales et al., 1992; Solana-Figueroa et al., 2002; Díaz-Trujillo et al., 2009) así como por la administración de sustancias que inactivan temporalmente la actividad eléctrica neuronal en diferentes regiones cerebrales (Giordano y Prado-Alcalá, 1982; Pérez-Ruiz y Prado Alcalá, 1989; Parent et al. 1992; Cobos-Zapíaín et al. 1996; Salado-Castillo et al., 2011) y particularmente por administración de fármacos que interfieren con la síntesis de proteínas o de ARNm en regiones particulares del cerebro (Rodríguez-Serrano et al., 2009; Torres-García, 2012). En todos los estudios mencionados previamente en este párrafo, el incremento en las sesiones de entrenamiento, o bien el incremento en la intensidad del estímulo aversivo aplicado al momento del entrenamiento, impidió el deterioro en la consolidación provocado por los diferentes tratamientos amnésicos.

Particularmente en el presente estudio, cuando los sujetos son entrenados con intensidades de choque eléctrico intermedia (2.0 mA) o relativamente alta (3.0 mA) la inhibición de la transcripción de ARNm en la amígdala no interfiere con el mantenimiento del trazo de memoria. Estos datos apoyan la propuesta de que *“...cuando un organismo es expuesto a un proceso de entrenamiento incrementado (una situación en la cual un sujeto recibe más sesiones de entrenamiento después de haberse alcanzado una asíntota, o es entrenado con intensidades de estimulación relativamente altas), se genera un efecto protector ante la exposición a tratamientos amnésicos.”* La explicación a este fenómeno observado postula que *“... posiblemente se genera una activación en paralelo de las regiones implicadas en un tipo de memoria particular, de tal forma que si incluso una o más de estas áreas se ven alteradas en su funcionamiento, las otras áreas reclutadas mantienen este trazo de información fuertemente adquirida”* (Prado-Alcalá, 1995).

Relacionado con la propuesta de Hebb, se ha desarrollado gran evidencia en donde se indica que los ensambles de memoria trabajan juntos para representar y preservar la información en el cerebro (Milner et al., 1998). Así pues, no es posible considerar al proceso de consolidación como un proceso unitario que depende únicamente de la integridad de una región cerebral, no existe un “centro único de la memoria”. En este sentido, para entender el almacenamiento de la memoria necesitamos evaluar la contribución temporal de diferentes regiones del cerebro implicadas en el almacenamiento de una experiencia aprendida (Izquierdo et al., 2006; citado por Medina et al., 2008). Aunado a lo anterior, una idea que ha surgido desde hace 19 años es que existen dos tipos de consolidación de la memoria: 1) implica eventos celulares y moleculares que ocurren inmediatamente después del entrenamiento y se extienden hasta unas horas o días después que tienen lugar en las regiones implicadas en la adquisición y consolidación de un tipo de memoria particular, este tipo de consolidación es llamada **consolidación sináptica o celular**; 2) el otro tipo de consolidación es llamada **consolidación a nivel de sistema**, la cual es lenta e implica la participación de regiones neocorticales y su interacción con estructuras relacionadas con la consolidación de un tipo particular de memoria, como las estructuras del lóbulo temporal medial. La estabilización del trazo de memoria se logra por una interacción gradual entre múltiples estructuras cerebrales (Medina et al., 2008). Aunado a esta propuesta que ha surgido desde hace 19 años, una explicación plausible ante la ocurrencia del fenómeno protector del entrenamiento incrementado es que la consolidación de la memoria a nivel de sistema se acelera, favoreciendo el reclutamiento e interacción entre las diversas áreas implicadas en el mantenimiento de la información hacia el largo plazo. De tal forma que aunque una de las regiones sustancialmente implicadas en la consolidación de un tipo de memoria aversiva como lo es la amígdala se vea deteriorada, como en este estudio por la inhibición de la transcripción, otras regiones involucradas en el mantenimiento del trazo de memoria son activadas y reclutadas rápidamente para sostener el trazo mnemónico.

El cerebro es un complejo neuronal recurrente o un sistema dinámico altamente plástico con múltiples vías de conexión entre estructuras. Se conoce desde el siglo XIX que los elementos neuronales del cerebro constituyen una formidable y complicada red estructural. Se ha descrito que las estructuras cerebrales y los sistemas funcionales se caracterizan por la formación de redes complejas altamente conectadas con estructuras moduladoras de actividad central tanto a una escala que implica el cerebro completo como se ha observado

en estudios de neuroimagen en humanos, como en una escala a nivel celular como se ha observado en estudios con animales no humanos. Un módulo es definido como una serie de nodos que están densamente interconectados unos con otros, pero que pueden esparcir sus conexiones con otros nodos en otros módulos. La vía de transmisión de la información entre dos estructuras cerebrales no es única, sino que existen rutas alternativas a través de las cuales la información puede fluir. La corteza cerebral es un sistema de procesamiento de información altamente interactivo y dinámicamente flexible. Aunque las regiones corticales puedan especializarse en procesar una información en particular, no operan de forma independiente, sino que son altamente influenciados unos a otros (Zamora-López et al., 2009).

Como es sabido, se ha descrito que la consolidación implica la interacción entre diferentes sistemas neuronales así como cambios celulares dentro de sistemas específicos, y que la amígdala es crítica para la modulación. Con relación al párrafo anterior, dos estudios apoyan la perspectiva de que la amígdala actúa como una estructura de modulación en la cual las conexiones entre sus nodos (conformados por los núcleos de los grupos basolateral y centromedial) se conecten a otros nodos en otros módulos (representados por otras estructuras cerebrales). En el primero de los artículos, Ponnusamy et al., en 2007, a través de la inactivación temporal del grupo basolateral de la amígdala (BLA), encontró que las ratas pueden adquirir un tipo de memoria al miedo sin la participación de la BLA cuando los animales fueron sometidos a una experiencia de sobre entrenamiento. Sin embargo, la inactivación en la BLA abole la expresión del miedo en ratas sobre entrenadas, cuando éstas fueron entrenadas con una BLA funcional. Su propuesta indica que en una situación de aprendizaje existen vías primarias y alternas capaces de mediar el almacenamiento de información y que en condiciones normales de entrenamiento la vía primaria es más eficiente, previniendo el uso de la vía alterna. Sin embargo, sugiere que cuando el circuito primario se ve comprometido (BLA), la vía alterna juega un papel compensatorio, proponiendo al núcleo central de la amígdala como un buen elemento dentro de la vía. En el segundo estudio Seidenbecher et al., en 2003, observaron un incremento en sincronización rítmica de actividad theta entre la amígdala lateral (LA) y el CA1 del hipocampo después del entrenamiento en una tarea de condicionamiento al miedo, la cual llega a ser significativa durante la identificación del estímulo condicionado y la expresión de la conducta de congelamiento. Esta sincronía de la actividad puede ser vista como la formación de una red amígdalo-hipocampal siendo un correlato neuronal de la evocación

de la memoria en el condicionamiento al miedo. Los estudios descritos anteriormente nos hacen inferir que la codificación de la memoria debe implicar, además de cambios en una sola sinapsis, cambios en múltiples sinapsis pertenecientes a circuitos y redes neuronales complejas entre la amígdala, el hipocampo, el estriado, la corteza y otras estructuras implicadas en el almacenamiento, mantenimiento y evocación de memorias particulares.

Finalmente a manera de resumen sobre la discusión podemos decir que bajo condiciones normales de entrenamiento la síntesis tanto de ARNm como de proteínas *de novo* son necesarias para producir cambios morfológicos expresados en modificaciones en las espinas dendríticas, favoreciendo la consolidación a nivel de sistema reflejada por el establecimiento y generación de circuitos y redes neuronales. Sin embargo, cuando un sujeto experimenta una situación de entrenamiento incrementado, los mecanismos empleados para el mantenimiento de esta fuerte memoria son diferentes, siendo independientes de la síntesis de ARNm, con lo que se puede pensar que el sistema se vale de los recursos que tiene en ese momento para formar, establecer y fortalecer contactos sinápticos con otras estructuras cerebrales implicadas en el almacenamiento de la memoria. Un mecanismo que podría estar empleando la amígdala en ausencia de la síntesis nueva de ARNm, podría ser, la maduración de ARNm inmaduros y la traducción de ARNm presentes en las espinas dendríticas que están siendo activadas durante el entrenamiento, produciendo los cambios morfológicos a nivel sináptico necesarios para generar circuitos y redes neuronales entre las estructuras que están participando en el almacenamiento de ese tipo de memoria. Asimismo estas estructuras cerebrales implicadas podrían estar siendo activadas en paralelo al momento en que se está produciendo la experiencia de entrenamiento incrementado, con lo que la alteración de la actividad de una o de un par de estructuras no podría deteriorar la evocación de la información fuertemente almacenada. Estudios posteriores son necesarios para poder dilucidar el correlato anatómico-funcional que subyace a la experiencia del entrenamiento incrementado.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos realizados muestran que en las latencias de adquisición y las de escape no hubo diferencias significativas entre los grupos. En este sentido, se puede sugerir que los efectos producidos por el DRB no fueron debido a un bloqueo inespecífico en el procesamiento de información ni a alteraciones motoras.

Por otra parte, en el experimento “Curva dosis-respuesta” al analizar la latencia de retención se observó que la administración intra-amígdala de DRB en dosis tanto de 40 ng/μl como de 80 ng/μl produjo un efecto amnésico cuando los sujetos fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con una intensidad de choque relativamente baja (1 mA). No obstante, el grupo al cual se le administró una dosis de 20 ng se comportó de manera similar al grupo vehículo; esto es, la dosis de DRB más baja evaluada en este experimento no produce un efecto amnésico. Con ello podemos inferir que al menos en estas condiciones experimentales (intensidad relativamente baja), la síntesis de ARNm en la amígdala es necesaria para la formación de la memoria de largo plazo en la tarea de evitación inhibitoria. Se eligió como dosis amnésica óptima la dosis de 80 ng/ 0.5 μl debido a que no muestra diferencias significativas en comparación a la dosis de 40 ng/ 0.5 μl. Además, esta dosis fue previamente evaluada por Duvarci y colaboradores en 2008 en animales que fueron entrenados en la tarea de condicionamiento de miedo al tono, y a pesar de que este grupo de investigación no reportó que hubiese efecto amnésico debido a la administración de esta dosis, es sustento de que dicha dosis no produce alguna alteración conductual que pudiese deteriorar la ejecución de los sujetos al momento de la evaluación de la tarea.

Al analizar los resultados obtenidos en el experimento “Dependencia de estado”, en cuanto a la latencia de retención, observamos que hubo diferencias significativas entre el grupo vehículo y el grupo experimental (DRB 80 ng). Con ello podemos inferir que la administración de DRB en la amígdala no produce un efecto estado-dependiente. Esto es, que la amnesia producida por la administración del fármaco DRB en dosis de 80 ng/μl, no fue debido a que el animal no se encontraba bajo el mismo estado en el cual aprendió la información y que esto fuera necesario para resolver la tarea, ya que si esto fuese el caso, no se habrían obtenido diferencias significativas en cuanto a la latencia de retención entre

los grupos experimental y control y ambos grupos habrían tenido buen desempeño en la prueba de retención de largo plazo.

Por otra parte, en cuanto al análisis de la latencia de retención en el experimento “Memoria de corto plazo”, no observamos diferencias significativas entre los grupos control (vehículo) y experimental (DRB 80 ng) al evaluar la memoria 30 minutos después del entrenamiento. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la prueba de retención 48 horas después del entrenamiento, encontramos que el grupo al cual se le administró la dosis amnésica óptima de DRB exhibió un deterioro en la memoria de largo plazo. Con ello podemos inferir que la administración de la dosis amnésica óptima de DRB en la amígdala no interfiere con el aprendizaje o adquisición de la información, puesto que la memoria de corto plazo no se ve afectada, si no que el efecto amnésico provocado por la dosis de 80 ng de DRB es debido a la interferencia en el proceso de consolidación, ya que la memoria de largo plazo se ve deteriorada.

Finalmente, en cuanto al experimento “Efecto del entrenamiento con intensidades de estimulación intermedia (2.0 mA) o alta (3.0 mA)” observamos que no hubo diferencias significativas entre los grupos experimental (DRB 80 ng) y control (vehículo) respecto a la latencia de retención. Esto indica que ante una situación de entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria, la administración de la dosis amnésica óptima de DRB en la amígdala no produce deterioro en la consolidación.

Los resultados nos permiten corroborar que ante una situación de entrenamiento moderado (en nuestro caso el entrenamiento con intensidad de 1.0 mA en la tarea de evitación inhibitoria), la inhibición de la síntesis de ARNm en la amígdala deteriora la consolidación de la memoria (Bailey et al., Schafe y LeDoux, 2000; Igaz et al., 2002; Cammarota et al., 2003; Parsons et al., 2006; Da Silva et al., 2008; Duvarci et al., 2008). Por otra parte, los resultados obtenidos respaldan la hipótesis sugerida de que ante una situación de entrenamiento incrementado se genera un efecto protector ante la exposición a tratamientos amnésicos (McGaugh, et al., 1995; Prado-Alcalá et al., 2012). Particularmente los hallazgos muestran que ante una situación de entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria, la inhibición de la síntesis de ARNm en la amígdala no deteriora la consolidación y por tanto mantiene la información de largo plazo. El sistema podría estarse valiendo de otros mecanismos para formar, establecer y fortalecer contactos sinápticos con otras estructuras cerebrales implicadas en el almacenamiento de la memoria (algunos de

estos mecanismos ya se mencionaron previamente en la discusión). Sin embargo es necesario el empleo de otras técnicas además de la conductual y farmacológica que nos permitan analizar de una manera más puntual cuál podría ser el sustrato anatómico, fisiológico y/o celular implicado en el entrenamiento incrementado.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aggleton, J. P. editor. 2000. The amygdala: a functional analysis. 2 Ed. New York: Oxford University Press.
- Alberini, C. M. 2008. The role of protein synthesis during the labile phase of memory: Revisiting the skepticism. *Neurobiol Lear Mem* 89: 234-146.
- Barrietos, R. M, O'Reilly, R. C y Rudy, J. W. 2002. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behav Brain Res* 134: 299-306.
- Bear, M. F, Connors BW y Paradiso MA. 2001. Neuroscience. Exploring the brain. 2 Ed. EUA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Bensaude, O. 2011. Inhibiting eukaryotic transcription. Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* 2: 103-108.
- Blair, U. T., Sotres-Bayon, F., Moita, M. A. P. y LeDoux, J. E. 2005. The lateral amígdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Neuroscience* 133: 561–569.
- Bliss, T. V. y Lomo, N. T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 331-356.
- Bramham, C. R y Wells, D. G. 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8: 776-789.
- Cajal SR. 1899. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Vol 1. Imprenta y librería de Nicolás Moya, Madrid
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Kerr, D., Medina, J. H, e Izquierdo, I. 2003. Inhibition of mRNA and Protein Synthesis in the CA1 Region of the Dorsal Hippocampus Blocks Reinstallment of an Extinguished Conditioned Fear Response. *J Neurosci* 23: 737–741.
- Canal, C. E, Chang, Q. y Gold, P. E. 2007. Amnesia produced by altered realease of neurotransmitters after intra injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Nat Acad Sci USA* 104: 12500-12505.
- Citri, A., Malenka, R. C. 2008. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Rev* 33: 18–41.

- Clement, J. Q., Wilkinson, M. F. 2000. Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *J Mol Biol* 299: 1179-91.
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A. 1996. High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiol Learn Mem* 65: 202-6.
- Cruz-Morales, S. E., Durán-Arévalo, M., Díaz del Guante, M. A., Quirarte, G. L. y Prado-Alcalá, R. A. 1992. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav Neural Biol* 57: 256-259.
- Da Silva, W. C., Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., Izquierdo, I. y Cammarota, M. 2008. Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory. *Hippocampus* 18: 29–39.
- Davis, H. P. y Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96: 518-559.
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Quirarte, G. L., Prado-Alcalá, R. A. 2009. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol Learn Mem* 91: 310-314.
- Doyle, M. y Kiebler, M. A. 2011. Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO JK* 30: 3540-3552.
- Dudai, Y. 2002. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12: 211-216.
- Dudai, Y. 2004. The Neurobiology of Consolidation, or How stable is the Engram? *Annu Rev Psychol*: 55: 51–86.
- Dudai, Y. y Eisenberg, M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44: 93-100.
- Duran-Arevalo, M., Cruz-Morales, S. E. y Prado-Alcalá, R. A. 1990. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res Bull* 24: 725-727.

- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., Prado – Alcalá, R. A. 2012. Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending of strength of training in rats. *Front Behav Neurosci* 6: 1-6.
- Giordano, M., y Prado-Alcalá, R. A. 1986. Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol Biochem & Behav* 24: 905-9.
- Gispen, W. H. 1993. Neuronal plasticity and function. *Clin. Neuropharmacol*, 16, S3-S11.
- Gomes N. P., Bjerke G., Llorente B., Szostek S. A., Emerson B. M., Espinosa J. M. 2006. Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program. *Genes Dev* 20: 601-612.
- Gómez-Palacio Schjetnan, A. 2009. Participación del BDNF en la modulación de la comunicación y la reorganización sináptica hipocampal. (Tesis de Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas). Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Gould E y Gross Ch. G. 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22 (3): 619-623.
- Harris, E. W., Ganong, A. H. Cotman, C. W. 1984. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 323: 132-137.
- Hebb, D. O. 1949. The organization of behavior. New York: Wiley.
- Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., e Izquierdo, I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22: 6781–6789.
- Kandel, E. R. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294: 1030-1038.
- Knapska, E., Radwanska, K., Werka, T., Kaczmarek, L. 2007. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev* 87: 1113- 1173.
- LeDoux, J. 2007. The amygdala. *Current Biol*, 17: R868-R874.
- Lisman, J., Schulman, H. y Cline, H. 2002. The molecular bases of CaMKII function in synaptic and behavioral memory. *Nat Rev Neurosci* 3: 175-190.

- McGaugh, J. L. 1966. Time-dependent process in memory storage. *Science* 153: 1351-1358.
- McGaugh, J. L. 2000. Memory- a Century of Consolidation. *Science* 287: 248-251.
- McGaugh, J. L. 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Ann Rev Neurosci* 27: 1-28.
- McGaugh, J. L., Bermúdez-Rattoni, F. y Prado-Alcalá, R. A. 1995. Plasticity in the central nervous system. 1995. USA: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. Mahwah, New Jersey.
- Medina, J. H., Bekinschtein, P., Cammarota, M. e Izquierdo, I. 2008. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Brain Res* 192: 61–69.
- Meinkoth, J. L., Alberts, A. S., Went, W., Fantozzi, D., Taylor, S. S., Hagiwara, M., Montminy, M., Feramisco, J. R. 1993. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* 179-186.
- Milner, B., Squire, L. R., Kandel, E. R. 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445- 468.
- Mirolli, M., Mannella, F., Baldassarre, G. 2010. The roles of the amygdala in the affective regulation of body, brain and behavior connection. *Science* 22: 215-245.
- Morgado-Bernal, I. 2011. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience* 176: 12-19.
- Müller, G. E. y Pilzecker, A. 1900. *Psycho*, 1, 1.
- Nader, K. y Hardt, O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10: 224-234.
- Nechaev, S. y Adelman, K. 2011. Pol II waiting in the starting gates: regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim Biophys Acta* 1809: 34–45.
- Ono, T., Nishijo, H., y Uwano, T. 1995. Amygdala role in conditioned associative learning. *Prog Neurobiol* 46: 401-422.
- Parent, M., Tomaz, C., McGaugh, J. L. 1992. Increased training in an aversively motivated task attenuates the memory-impairing effects of post-training N-methyl-D-aspartate-induced amygdala lesions. *Behav Neurosci* 106: 789-97.

- Parsons, R. G., Gafford, G. M., Baruch, D. E., Riedner, B. A. y Helmstetter, F. J. 2006. Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *Eur J Neurosci* 23: 1853–1859
- Paxinos, G. y Watson, C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego California: Academia.
- Pedreira, M. E., Dimant, B. y Maldonado, H. 1996. Inhibitors of Protein and RNA Synthesis Block Context Memory and Long-Term Habituation in the Crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 611-617.
- Ponnusamy, R., Poulos, A. M. y Fanselow, M. S. 2007. Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. *Neuroscience* 147: 919-926.
- Prado-Alcalá, R. A. 1995. Serial and parallel processing during memory consolidation. En: Plasticity in the Central Nervous System. Learning and Memory. Editado por J. L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni, y R. A. Prado-Alcalá, Lawrence Erlbaum Publishers, Mahawah, New Jersey, U.S.A.. ISBN 0-8058-1573-2.
- Prado-Alcalá RA, Medina AC, López NS, Quirarte GL. 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. *Rev Neurosci* 23: 501-508.
- Qi, Z. y Gold, P. E. 2009. Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine and acetylcholine. *Learn Mem* 16: 308-3014.
- Quiroz, C., Martinez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Diaz-Cintra, S., Prado-Alcalá, R. A. 2003. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experim Brain Res* 153: 400-2.
- Rodríguez-Ortiz, C., Garcia-DeLaTorre, P., Benavidez, E., Ballesteros, M., Bermudez-Rattoni, F. 2008. Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiol Learn Mem* 89: 352- 359.

- Rodríguez-Serrano L. M. 2010. Efectos de la microinyección de anisomicina en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje mediado por niveles altos y bajos de reforzamiento. (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro.
- Rosenblum, K., Meiri, N. y Dudai, Y. 1993. Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59: 49-56.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez, G. M. I, Prado-Alcalá, R. A. 2011. Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Front Behav Neurosci* 5: 1-7.
- Seidenbecher, T., Laxmi, T. R., Stork, O., Pape H-Ch. 2003. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. *Science* 301: 846-850.
- Sharma, A. V., Nargang, F. E. y Dickson, C. T. 2012. Neurosilence: Profound suppression of neural activity following intracerebral administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin. *J Neurosci* 32: 2377-2387.
- Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B. T., Patton, J. G., Singer, R. H., Zipori, D. 2005. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* 16: 2395-2413.
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., Prado-Alcala, R. A. 2002. Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sci* 71: 391-399.
- Squire, L. R. y Barondes, S. 1970. Actinomycin-D: effects of memory at different times after training. *Nature* 225: 649-650.
- Squire, L. R. y Kandel, E. R. 2000. Memory. From Mind to Molecules. USA, New York: Scientific American Library.
- Sweatt, J. D. 2010. Mechanims of memory. 2 Ed. USA, San Diego: Elsevier.
- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C. y Kasai, H. 2008. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319: 1683-1687.

- Tomaz, C., Dickinson-Anson, H. y McGaugh, J. L. 1991. Amygdala lesions block the amnesic effects of diazepam. *Brain Res* 586: 85-91.
- Tomaz, C., Dickinson-Anson, H. y McGaugh, J. L. 1992. Basolateral amygdala lesions block diazepam-induced anterograde amnesia in an inhibitory avoidance task. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: 3615-3619.
- Torres-García, M. E. 2012. Efecto de la inhibición de la transcripción en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado. (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro.
- Wang, H., Hu, Y. y Tsien, J. Z. 2006. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 79: 123-135.
- Zamora-López, G., Zhou, C. y Kurths, J. 2009. Graph analysis of cortical networks reveals complex anatomical communication substrate. *Chaos* 19: 015117-1 a 015117-7.
- Zandomeni, R., Mittleman, B., Bunick, D., Ackerman, S., Weinmann, R. 1982. Mechanism of action of dichloro-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole: effect on in vitro transcription. *Proc Nat Acad Sci USA* 79: 3167-3170.

12. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación temporal de la memoria

Figura 2 Mecanismos moleculares desencadenados por la LTP

Figura 3 Núcleos de la amígdala de la rata y sus divisiones

Figura 4 Proyecciones aferentes y eferentes de algunos núcleos específicos de la amígdala

Figura 5 Ciclo de transcripción a cargo de la ARNP II

Figura 6 Mediana de las latencias de retención a lo largo de las sesiones de extinción diarias (EXT1-EXT6) mostrando los grupos que han sido entrenados en la tarea de evitación inhibitoria con 1.0, 2.0 ó 3.0 mA

Figura 7 Esquema representativo en donde se muestra la ubicación bilateral de cánulas en el complejo amigdalino (CA)

Figura 8 Cámara de evitación inhibitoria

Figura 9 Representación de la ubicación bilateral de las cánulas en el complejo amigdalino

Figura 10 Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento experimental curva dosis/respuesta

Figura 11 Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento experimental dependencia de estado

Figura 12 Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento experimental memoria de corto plazo

Figura 13 Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento experimental de la segunda fase experimental

Figura 14 a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos

Figura 15 Latencia de retención en segundos

Figura 16 a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos

Figura 17 Latencia de retención en segundos

Figura 18 a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos

Figura 19 Latencias de retención en segundos de la memoria de corto plazo (MCP) y de la memoria de largo plazo (MLP)

Figura 20 a) Latencia de entrada en segundos, b) Latencia de escape en segundos

Figura 21 Latencia de retención en segundos

13. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Asignación de grupos (Experimento 1)

Tabla 2 Asignación de grupos (Experimento 2)

Tabla 3 Asignación de grupos (Experimento 3)

Tabla 4 Asignación de grupos (Experimento 4)

14. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

LTP	Potenciación de Largo Plazo
NMDA	N-metil-D-aspartato
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio-calmodulina II.
PKC	Proteína cinasa dependiente de calcio
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
CREB	Proteína de unión al elemento responsivo de AMPc
ERK	Proteína cinasa regulada por una señal extracelular
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DRB	5,6- Dichlorobenzimidazol ribósido
Hdm2	Mejor conocida como Mdm2, doble murina 2 minutos
NELFs	Factores de elongación negativos
P-TEFb	Factor de elongación de la transcripción positivo
CDK9	Cinasa caseína 9

APÉNDICE I

Representación esquemática de la ubicación de las puntas de los inyectores en la región de la amígdala.

En las siguientes imágenes se muestran la localización bilateral de las puntas de los inyectores de todos animales con implantación en la amígdala, estudiados en el proyecto. En total se tiene una “n” de 93 animales, lo cual indica que se ubicaron 186 puntas de inyectores. Esquemas modificados de Paxinos y Watson, 1998.

