



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES

*Memoria dependiente de estado inducida
por antagonistas de receptores NMDA y
AMPA en una tarea de ORM*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA

ALDO PERERA LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL OSORIO GÓMEZ

REVISOR DE TESIS: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AGOSTO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a mis padres y mis hermanos, pues gracias a sus enseñanzas, cuidado y cariño me he convertido en la persona que soy hoy, los amo.

También quiero agradecer a mi pareja, compañera y soporte en la vida, Erendira, porque las palabras no me alcanzan para describir lo maravillosa que hace mi vida y lo mucho que la ha enriquecido. Ella me ha apoyado, me ha dado su amor, cariño, confianza y guía. Soy muy afortunado de haber conocido a una mujer como ella, que en buenas y malas situaciones está a mi lado, que ha visto mis sonrisas, lágrimas, éxitos y fracasos; y que me enamora cada día que paso a su lado.

De igual manera quiero agradecer profundamente a sus padres, Elizabeth y Joaquín, quienes son mi segunda familia, quienes me han apoyado y aceptado como un hijo más.

También quiero agradecer a mis amigos de la facultad y del laboratorio; de entre quienes destacan: Emiliano, José, Karina y Arturo; colegas, consejeros y guías, que aportaron tiempo, esfuerzo y dedicación para la realización de este trabajo.

Especialmente quiero agradecer al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, quien me aceptó en su grupo de trabajo y me brindó facilidades, así como también al Dr. Daniel Osorio Gómez, un gran amigo y mentor, cuyo esfuerzo representa una parte esencial de este proyecto. Además, quiero reconocer su dedicación y paciencia conmigo, y su disposición permanente a apoyarme.

No puedo olvidarme de mi universidad, la UNAM; que incluye a sus profesores, trabajadores, estudiantes y colaboradores; que me ha dado tanto y que me ha proporcionado un espacio para desarrollarme como profesionista que no podría encontrar en ningún otro lugar.

Quiero, de igual manera, extender mi agradecimiento a todos aquellos que me han dado su apoyo y amistad durante los años en que he cursado mi carrera universitaria.

Por último, si de algo sirve, quiero reconocer a los animales de laboratorio que hicieron posible mi tesis y hacen posibles otros tantos proyectos. Espero haberlas tratado con respeto y cariño, y quiero que la gente sepa que sin ellas la ciencia no avanzaría. En nombre de la humanidad, gracias.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de aprendizaje y memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 250870 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN208616.

CONTENIDO

RESUMEN	2
ANTECEDENTES	4
APRENDIZAJE Y MEMORIA	4
CLASIFICACIÓN DE LA MEMORIA	5
LA MEMORIA Y EL SISTEMA NERVIOSO	7
NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA	8
EL GLUTAMATO Y LA MEMORIA	9
MEMORIA DE RECONOCIMIENTO	11
TAREA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS (ORM)	12
SUSTRATOS ANATÓMICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO	13
ORM Y TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA	16
HIPÓTESIS DE INTEGRACIÓN DE LA MEMORIA COMO ALTERNATIVA A LA HIPÓTESIS DE CONSOLIDACIÓN	17
DEPENDENCIA DE ESTADO Y TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA	19
DEPENDENCIA DE ESTADO EN ORM	20
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVOS	22
HIPÓTESIS	23
MATERIALES Y MÉTODO	24
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	31
RESULTADOS	31
HISTOLOGÍA	31
RESULTADOS EXPERIMENTO 1	32
RESULTADOS EXPERIMENTO 2	34
RESULTADOS EXPERIMENTO 3	36
RESULTADOS EXPERIMENTO 4	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	45

RESUMEN

La administración de fármacos amnésicos ha derivado en la postulación de la hipótesis de consolidación de la memoria, que propone que las memorias recién formadas son susceptibles y lábiles a tratamientos que impiden los procesos plásticos. Sin embargo, recientemente se ha propuesto una hipótesis alternativa, la cual sugiere que los efectos amnésicos provocados se integran al trazo de memoria recién formado, generando así un fenómeno de memoria dependiente de estado; la cual requiere del mismo estado fisiológico durante su establecimiento y su evocación para que sea recordada eficientemente.

En el presente trabajo, se evaluó la hipótesis de integración de memoria; donde se probó si dos agentes amnésicos, un antagonista de los receptores NMDA o un antagonista de los receptores AMPA, administrados en la corteza insular de ratas macho Wistar, pueden generar una memoria dependiente de estado en la tarea de reconocimiento de objetos. Además, se indagó si el tiempo de acción de los fármacos es un factor que puede contribuir a generar una memoria de este tipo. Los resultados muestran que la administración de un antagonista de los receptores NMDA y AMPA bloquea la consolidación y la evocación de la tarea, respectivamente. No obstante, ambos fármacos pueden generar una memoria dependiente de estado siempre y cuando se prolongue su tiempo de acción y la administración ocurra únicamente dentro de una ventana menor a los 120 minutos luego de la adquisición de la tarea.

Este trabajo resalta la importancia de considerar la dependencia de estado en procesos de la memoria como la consolidación y a replantear el papel de los agentes amnésicos en el entendimiento de la formación de la memoria.

Abreviaturas

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

AP5: Ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico.

CaMKII: Cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II.

CI: Corteza insular.

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona.

CREB: Factor de transcripción de respuesta a adenosín monofosfato cíclico (CREB, *cAMP response element binding protein*).

ISP: Inhibidores de síntesis de proteínas.

NMDA: N-metil-D-aspartato.

ORM: Tarea de memoria de reconocimiento de objetos (Object recognition memory task).

OF: Objeto familiar.

ON: Objeto novedoso.

PKC: Proteína cinasa C.

SS: Solución salina.

ANTECEDENTES

APRENDIZAJE Y MEMORIA

Los organismos, incluidos los seres humanos, requieren adaptarse a un medio ambiente cambiante para sobrevivir. Un mecanismo esencial que permite la adaptación de los organismos es el aprendizaje, el cual es definido como el proceso por el cual la conducta sufre cambios duraderos por medio de la experiencia (Domjan, 2010). Por su parte, la conducta se define como el conjunto de respuestas o reacciones a estímulos del medio ambiente de un organismo que son susceptibles de ser cuantificadas (Galimberti, 2002). Esta cuantificación es, por ejemplo, a través del número de veces que un animal acciona una palanca o la cantidad de palabras que una persona es capaz de recordar en un lapso de quince minutos, etc.

Dentro de las ciencias de la conducta, el aprendizaje representa uno de los campos más importantes, pues a pesar de que muchas de las conductas necesarias para sobrevivir no requieren experiencia, tales como las funciones fisiológicas básicas como la respiración, digestión e incluso los reflejos; se considera que es por medio del estudio del aprendizaje que se puede comprender los procesos que sí requieren de cambios conductuales debidos a la experiencia, que van desde procesos tan sencillos como el retroceder ante una amenaza o tan complejos como manejar un automóvil (Domjan, 2010).

La conducta es moldeable por la experiencia gracias a otro mecanismo básico llamado memoria. Esta es definida como el proceso por medio del cual la información se obtiene, almacena y recupera (Kandel, Schwartz y Jessell, 2001). Así, se puede decir que la memoria es indispensable para que la información que se obtiene durante el aprendizaje se mantenga a lo largo del tiempo.

CLASIFICACIÓN DE LA MEMORIA

La memoria es un proceso que sustenta la información que conlleva a cambios conductuales. En este sentido, la información almacenada en la memoria puede variar dependiendo del tipo de conocimiento adquirido. A través de experimentación, principalmente con humanos, se han hecho hallazgos que han dado lugar a la clasificación del tipo de información almacenada en la memoria (*Figura 1*). La mayor de estas clasificaciones distingue entre memoria declarativa o explícita y no declarativa o implícita.

La memoria declarativa a su vez se subdivide en dos categorías; la primera es llamada memoria semántica, y se relaciona con hechos y conocimiento conceptual, mientras la segunda categoría, llamada memoria episódica, se refiere a eventos autobiográficos experimentados por el sujeto en cuestión y que tienen que ver con el qué, dónde y cuándo sucedió (Bear, Connors y Paradiso, 2016).

La memoria no declarativa se puede dividir en varias categorías. La primera categoría es el aprendizaje motor, definido como patrones de movimiento adquiridos por medio de la repetición (Gluck, Mercado y Myers, 2009). La segunda categoría es el aprendizaje perceptual, tal como el *priming*, que es la facilitación del aprendizaje dada la presentación previa de ciertos estímulos. Un ejemplo de *priming* es identificar una palabra completa a partir de información incompleta previamente presentada (Sternberg y Sternberg, 2015). Una tercera categoría es el condicionamiento o aprendizaje asociativo, en el cual se aprende mediante la asociación, ya sea espacial o temporal, de dos o más estímulos. Tal es el caso de condicionamiento clásico, donde un estímulo que genera una respuesta no voluntaria es asociado con un estímulo neutro, lo que lleva a que el estímulo neutro genere la respuesta no voluntaria inicial. Por último, se encuentra el aprendizaje no asociativo, que incluye a la habituación y a la sensibilización. En la habituación

hay una respuesta disminuida tras la presentación repetida de un mismo estímulo, mientras en la sensibilización hay una respuesta aumentada tras la presentación de un estímulo saliente (Bear et al., 2016).

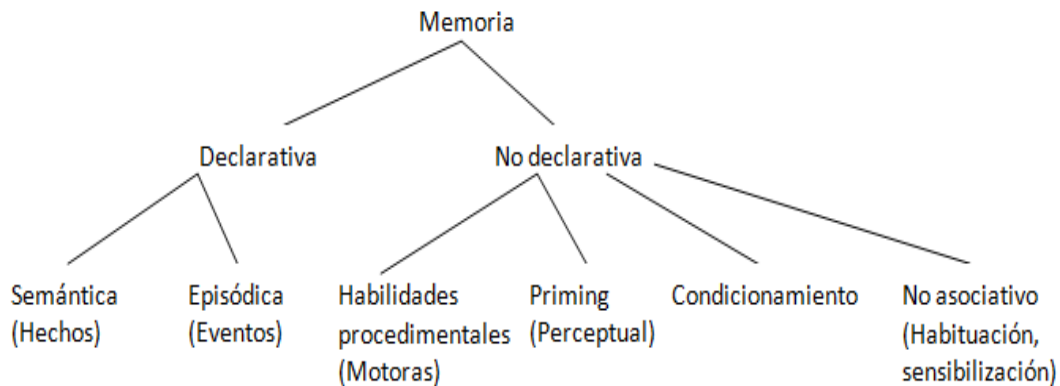


Figura 1. Clasificación de la memoria (Sternberg y Sternberg, 2012).

Existe otra clasificación de la memoria de acuerdo al tiempo durante el cual es mantenida la información. Según este modelo, la memoria se puede dividir en tres almacenes: el primer almacén es el sensorial, el cual mantiene poca cantidad de información proveniente del medio ambiente por periodos muy cortos de tiempo, el segundo almacén es llamado memoria a corto plazo y mantiene la información por periodos más largos que el almacén sensorial, sin embargo, tiene una capacidad limitada en cuanto a cantidad. Por último, está el almacén a largo plazo que contiene la información por muy largos periodos de tiempo, incluso indefinidamente, y tiene una capacidad mucho mayor que los dos almacenes anteriores (Sternberg y Sternberg, 2012).

Por otro lado, se han propuesto tres etapas o fases de la memoria durante las cuales la información puede ingresar a uno de los tres almacenes, o bien, recuperarse luego de haber sido almacenada. Estas fases son: la adquisición, la consolidación y la evocación (Abel y Lattal,

2001). La adquisición se refiere a la retención de la información sensorial en la memoria de corto plazo. Durante la consolidación, la información recién adquirida se hace estable y se mantiene por un largo plazo, en un proceso que no requiere necesariamente de la retención a corto plazo (McGaugh, 2000). Por último, la evocación se refiere a la recuperación de la información previamente almacenada.

LA MEMORIA Y EL SISTEMA NERVIOSO

Para comprender cómo se forma y se mantiene la memoria, diversos pensadores e investigadores científicos han recurrido a buscar las bases fisiológicas de la misma. Hoy en día se sabe que el sistema nervioso es el responsable de que la memoria sea posible.

En el sistema nervioso, las neuronas reciben y procesan la información del organismo. Estas se comunican por medio de las sinapsis, donde las neuronas transmiten la información a través de mensajeros químicos, llamados neurotransmisores. En la estructura de la sinapsis, se llama neurona presináptica a aquella que "manda" el mensaje químico, mientras que la neurona postsináptica es aquella que "recibe" el mensaje. La neurona postsináptica contiene receptores específicos para el neurotransmisor enviado desde la neurona presináptica (Gluck et al., 2009). A pesar de esta descripción clásica, existe comunicación bidireccional entre las neuronas pre y postsináptica, e incluso retroalimentación hacia la misma célula presináptica (Carlson, 2014).

Donald O. Hebb en 1949, estableció que los conjuntos de neuronas que se encuentran activos de manera continua y simultánea tienden a establecer conexiones fuertes entre ellas (Kandel et al., 2001). Este postulado, llamado teoría de ensamble neuronal, derivó en la teoría más aceptada sobre cómo el sistema nervioso almacena la información obtenida por la experiencia: la teoría de plasticidad sináptica. Esta teoría establece que las sinapsis sufren modificaciones debido a su

actividad. Dichas modificaciones llevan a cambios en la efectividad de la comunicación sináptica que son necesarios y suficientes para el almacenamiento de la memoria (Martin, Grimwood y Morris, 2000).

La teoría de plasticidad sináptica y los avances en biología celular y molecular han permitido comprender cómo se almacena la información en términos de la fisiología neuronal. De manera general, la retención a corto plazo se ha vinculado a cambios fisiológicos transitorios en las neuronas, como la modulación a la alta o a la baja de la liberación de neurotransmisores; mientras que el establecimiento a largo plazo parece requerir de cambios relativamente permanentes, que pueden modificar a las neuronas estructuralmente y funcionalmente (Bear et al., 2016; Kandel, Dudai y Mayford, 2014); finalmente, la evocación necesita de la reactivación del trazo de memoria como resultado de información ambiental entrante (Sara, 2000).

NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

El glutamato es un aminoácido que se encuentra ampliamente distribuido por el cerebro y la médula espinal; y es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso. Se han identificado receptores glutamatérgicos ionotrópicos y metabotrópicos; los primeros permiten el paso de iones, átomos cargados eléctricamente que alteran directamente la actividad eléctrica de las neuronas; mientras que los segundos están asociados a proteínas G. En resumen, existen tres principales receptores ionotrópicos de glutamato: el receptor AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), el cual es permeable a los iones sodio (Na^+) y potasio (K^+); el receptor de kainato que también permite el paso de los iones Na^+ y K^+ ; y el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) que tiene la peculiaridad de permitir el flujo de iones calcio (Ca^{2+}) además de Na^+ y K^+ . Los receptores NMDA tienen la característica de permitir el paso de cationes únicamente cuando la neurona postsináptica está suficientemente despolarizada, es decir por

encima de su umbral para generar un potencial eléctrico, liberando así un tapón de magnesio (Mg^{2+}) (Pankevich, Davis y Altevogt, 2011).

De manera general, los receptores ionotrópicos de glutamato coexisten en la membrana postsináptica y tienen actividad conjunta durante la neurotransmisión glutamatérgica. Sin embargo, la respuesta postsináptica es más rápida y breve cuando se activan los receptores AMPA y kainato. En contraste, el receptor NMDA produce una respuesta más lenta y sostenida, debido a que la activación del receptor NMDA requiere de la despolarización previa de la neurona mediante la respuesta de los receptores AMPA y kainato (Purves et al., 2004).

Los receptores metabotrópicos de glutamato involucran la unión del neurotransmisor al receptor, lo que ocasiona la activación de proteínas ligadas al receptor, llamadas proteínas G, las cuales pueden moverse por el medio intracelular y activar proteínas efectoras. Estas proteínas pueden ser canales iónicos o bien enzimas que modifican indirectamente la actividad neuronal a través de segundos mensajeros intracelulares (Lüscher y Malenka, 2012). Se han identificado ocho receptores metabotrópicos, nombrados de mGlu1 a mGlu8, que se clasifican en tres clases (I, II y III) según las vías intracelulares involucradas y los fármacos agonistas que los activan. De manera general, los receptores del grupo I activan a la enzima fosfolipasa C, mientras los del grupo II y III llevan a la inhibición de la adenilato ciclasa (Dingledine y McBain, 2008).

EL GLUTAMATO Y LA MEMORIA

Existe evidencia de que el uso de antagonistas de receptores metabotrópicos de glutamato impide la consolidación de tareas espaciales, de miedo condicionado, etc. (Riedel, Platt y Micheau 2003). Además, se ha descrito que animales transgénicos que no expresan este tipo de receptores carecen de fenómenos electrofisiológicos relacionados a la memoria, como la

potenciación o depresión a largo plazo (Niswender y Conn, 2010). Sin embargo, su papel directo en el aprendizaje y la memoria es contradictorio y solo algunos tipos de memoria parecen depender de los receptores metabotrópicos de glutamato (Riedel, 1996).

Por otro lado, los receptores AMPA y NMDA han sido ampliamente estudiados, de tal manera que su papel en la adquisición, consolidación y evocación de la memoria es más claro.

La adquisición depende de la actividad de los receptores AMPA, pues su inactivación por medio de antagonistas impide que los animales aprendan diversas tareas, mientras que esta misma inactivación no afecta la retención a largo plazo una vez ocurrida la adquisición (Riedel, Platt y Micheau, 2003).

La retención de la memoria ha sido fuertemente vinculada al aumento de la actividad neuronal mediante la entrada de cationes por medio de los receptores AMPA y NMDA (Dingledine y McBain, 2008; Riedel, Platt y Micheau, 2003). No obstante, es la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA la que desencadena los procesos plásticos de la memoria (Lüscher y Malenka, 2012). La entrada de Ca^{2+} a la célula conduce, entre otros efectos, a la activación de segundos mensajeros intracelulares como son la cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII), la proteína cinasa C (PKC) y diversas fosfatasa, que regulan la eficiencia en la comunicación sináptica. De manera general, los cambios temporales en proteínas y elementos previamente existentes en la neurona corresponden a la formación de memorias a corto plazo (Kandel et al., 2014). En cambio, para que la información se consolide y se mantenga a largo plazo, se requiere que los cambios plásticos resistan a la degradación. Para ello, la consolidación es desencadenada a través de cambios en la expresión de los genes que intervienen en la síntesis de nuevos receptores, nuevas espinas dendríticas y en general, una remodelación de las sinapsis. Comúnmente, los cambios plásticos se deben a la actividad del factor de transcripción de

respuesta a adenosín monofosfato cíclico (CREB, *cAMP response element binding protein*, por sus siglas en inglés) (Dudai, 2002). CREB favorece la transcripción de un fragmento de ADN a ARN mensajero (ARNm), el cual es el primer paso para la síntesis de nuevas proteínas (Latchman, 1993). Existe evidencia de que el influjo de Ca^{2+} , a través de los receptores NMDA, lleva a un aumento del calcio intracelular mediante la liberación de calcio desde el interior del retículo endoplásmico. El aumento del Ca^{2+} permite la activación del complejo Calcio-calmodulina (CaM), el cuál transloca al núcleo promoviendo la fosforilación y activación de CREB (West, Griffith y Greenberg, 2002; Yan, et al., 2016).

Finalmente, la evocación es la fase de la memoria de la que se conoce menos a nivel molecular en comparación a la adquisición y la consolidación. Se sabe que durante la evocación no sólo se reactiva el trazo de memoria que contiene la información; además es un proceso reconstructivo en donde la memoria puede volverse lábil de nueva cuenta y susceptible de ser modificada (Ben-Yakov, Dudai y Mayford, 2015). La información que se tiene hasta ahora sobre la evocación es gracias a los estudios donde se causa amnesia retrógrada a través de lesiones cerebrales y fármacos amnésicos (Gallo, 2007). De manera particular, se ha demostrado que la evocación es dependiente de los receptores AMPA, ya que su bloqueo mediante antagonistas impide la evocación de tareas conductuales, como evitación pasiva y tareas de reconocimiento en modelos animales (Izquierdo et al., 1993; Winters y Bussey, 2005).

MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

Como parte del repertorio conductual adaptativo, los organismos son capaces de identificar los objetos, lugares o eventos específicos que han experimentado previamente. A este subtipo de memoria declarativa se le ha llamado memoria de reconocimiento (Squire, Wixted y Clark, 2007). La memoria de reconocimiento tiene dos componentes independientes: el poder juzgar la

familiaridad o novedad de los estímulos, y la recolección de información contextual, ya sea espacial o temporal, con respecto a estos (Warburton y Brown, 2015). Por ejemplo, reconocer a una persona, y por otra parte, recordar el momento y circunstancias del encuentro, son ejemplos de familiaridad y recolección, respectivamente.

TAREA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS (ORM)

Se han desarrollado diversas tareas conductuales para modelos animales y humanos que son utilizadas para estudiar la memoria de reconocimiento y sus mecanismos neurales. Entre ellas, está la prueba de reconocimiento de objetos (ORM, por sus siglas en inglés: *object recognition memory task*) para roedores, donde se evalúa el componente de familiaridad, dejando de lado las variables sobre el contexto (Antunes y Biala, 2012). Esta prueba no involucra reforzamiento o asociación entre estímulos, únicamente se sirve de la tendencia natural de los roedores a explorar los objetos novedosos. La tarea consiste en presentar a los sujetos experimentales una serie de objetos durante dos sesiones. Hay una sesión de entrenamiento con dos objetos idénticos y una sesión de prueba donde se presenta un objeto idéntico a los de la fase de entrenamiento y uno novedoso, con la finalidad de evaluar si los sujetos pueden discriminar entre el estímulo novedoso y el familiar. Para evaluar la discriminación en la tarea de ORM se mide el tiempo que los sujetos pasan explorando los dos objetos iguales durante la sesión de entrenamiento y de igual manera se mide el tiempo de exploración de los objetos novedoso y familiar durante la sesión de prueba. Si los sujetos exploran más tiempo el objeto novedoso que el familiar se considera que la tarea se evocó correctamente (Balderas, Rodríguez-Ortiz y Bermúdez-Rattoni, 2014).

Esta tarea es un buen modelo experimental para el estudio de la memoria, ya que los animales deben explorar los objetos presentados y reconocer el objeto novedoso del familiar, a diferencia de otras tareas como la evitación pasiva o el condicionamiento al miedo, donde la disminución

del movimiento es utilizada como una medición de la memoria y que puede ser causada por los efectos colaterales de los fármacos amnésicos y no así por la correcta evocación de la memoria.

SUSTRATOS ANATÓMICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

Uno de los primeros estudios científicos sobre la pérdida de memoria declarativa, la cual incluye a la memoria de reconocimiento, fue el que llevaron a cabo Milner y Scoville en 1957. En dicho estudio, se reportó el caso del paciente H.M., a quien, debido a un caso de epilepsia, se le extrajo de manera bilateral una gran parte del lóbulo temporal medial. Como consecuencia, H.M. perdió la capacidad para formar nuevas memorias declarativas, por ejemplo, reconocer lugares o personas nuevas. Sin embargo, H.M. aún era capaz de generar nuevas memorias motoras, como el aprendizaje de habilidades manuales (Ramírez-Amaya, 2007). Gracias a este hallazgo, así como al estudio de pacientes humanos mediante el uso de imagenología cerebral, se ha vinculado a las áreas del lóbulo temporal, como el hipocampo y áreas corticales adyacentes, entre ellas la corteza entorrinal y perirrinal (*Figura 2*) (McGaugh, 2007) con la formación de la memoria explícita o declarativa.

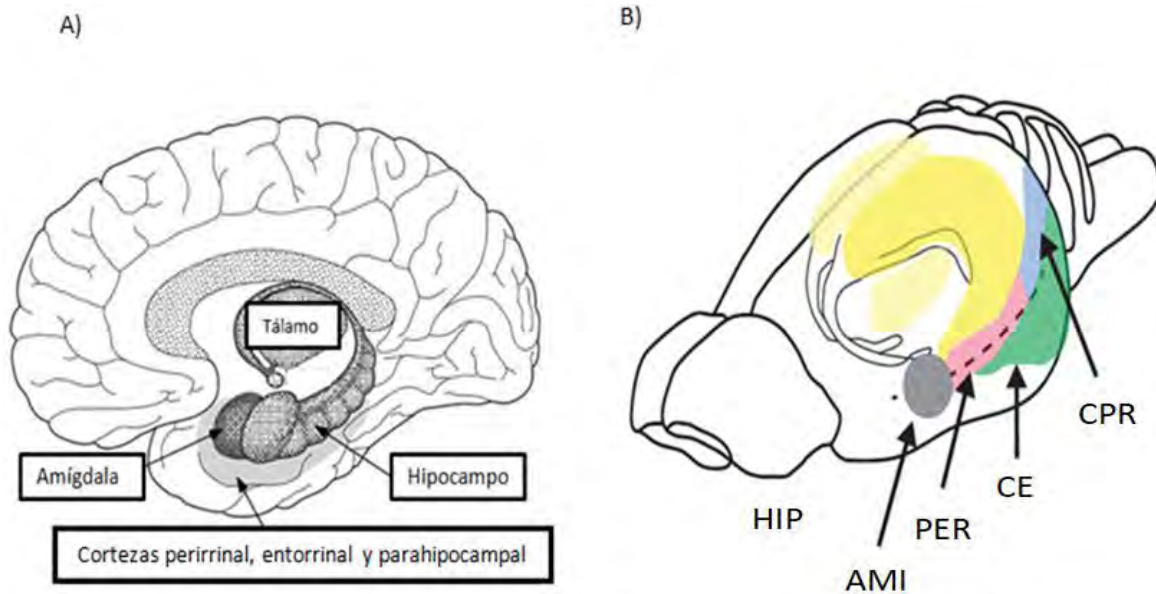


Figura 2. A) Vista sagital, áreas cerebrales del sistema de memoria del lóbulo temporal medial en humanos (modificado de Nelson, Thomas y de Haan, 2007). B) Áreas cerebrales del sistema de memoria del lóbulo temporal en ratas: HIP (Hipocampo), AMI (Amígdala), PER (Corteza perirrinal), CE (Corteza entorrinal), CPR (Corteza postrinal) (Modificado de Kesner, 2013).

Se sabe que el hipocampo juega un papel importante en la memoria de reconocimiento, sobre todo cuando las tareas involucran los componentes contextuales del reconocimiento, y un papel menos vital cuando se trata solo de la familiaridad de los estímulos (Balderas, Rodríguez-Ortiz y Bermúdez-Rattoni, 2014; Broadbent, Squire y Clark, 2004). Las lesiones en el hipocampo pueden llegar a producir déficits en la formación de memorias de tareas como el ORM. Sin embargo, otras áreas, como la corteza perirrinal, que envía información hacia el hipocampo y recibe a su vez información sensorial de otras áreas cerebrales, juegan un papel más importante para la formación y retención a largo plazo de memorias sobre la familiaridad de los objetos (Antunes y Biala, 2012).

Recientemente la corteza insular (CI) ha despertado el interés dentro del estudio de la memoria de reconocimiento. La CI se encuentra adyacente al hipocampo y la corteza perirrinal, y está situada en el lóbulo temporal lateral de primates y humanos; para los roedores, la CI se encuentra entre el surco rinal y la arteria cerebral medial. La CI ha sido relacionada al procesamiento de sabores, emociones y estados corporales derivados de la somatosensación (Moraga-Amaro y Stehberg, 2012). Según su estructura celular y conectividad con otras regiones, la CI se ha subdividido en tres áreas: granular, disgranular y agranular (Bermúdez-Rattoni, 2014) (*Figura 3*). A pesar de ser a menudo conocida como la corteza gustativa, no toda la CI está involucrada en el procesamiento de sabores. Las cortezas granular y disgranular tienen conexiones con áreas relacionadas al procesamiento somatosensorial, la percepción de tacto, dolor, posición del cuerpo, entre otras (Bear et al., 2016). Mientras que la CI granular conecta con áreas frontales y del tálamo relacionadas a la percepción y ejecución del movimiento (Shi y Cassel, 1998; Bermúdez-Rattoni, 2014).

La CI también se encuentra anatómicamente vinculada con la corteza perirrinal y ha sido relacionada con funciones perceptuales y con otras actividades cognitivas como la integración sensoriomotora, el procesamiento emocional y en fechas recientes se ha relacionado con la consolidación de memoria de reconocimiento. Es posible que la CI intervenga en el reconocimiento de la familiaridad–novedad de los estímulos, no solo los gustativos. La participación de la CI en la memoria de reconocimiento se ha evaluado a través del bloqueo de la transmisión colinérgica, así como de la inhibición de síntesis de proteínas, observando un déficit tanto en el reconocimiento de sabores como en la consolidación del ORM (Bermúdez-Rattoni, Okuda, Roozendaal y McGaugh, 2005; Bermúdez-Rattoni, 2014).

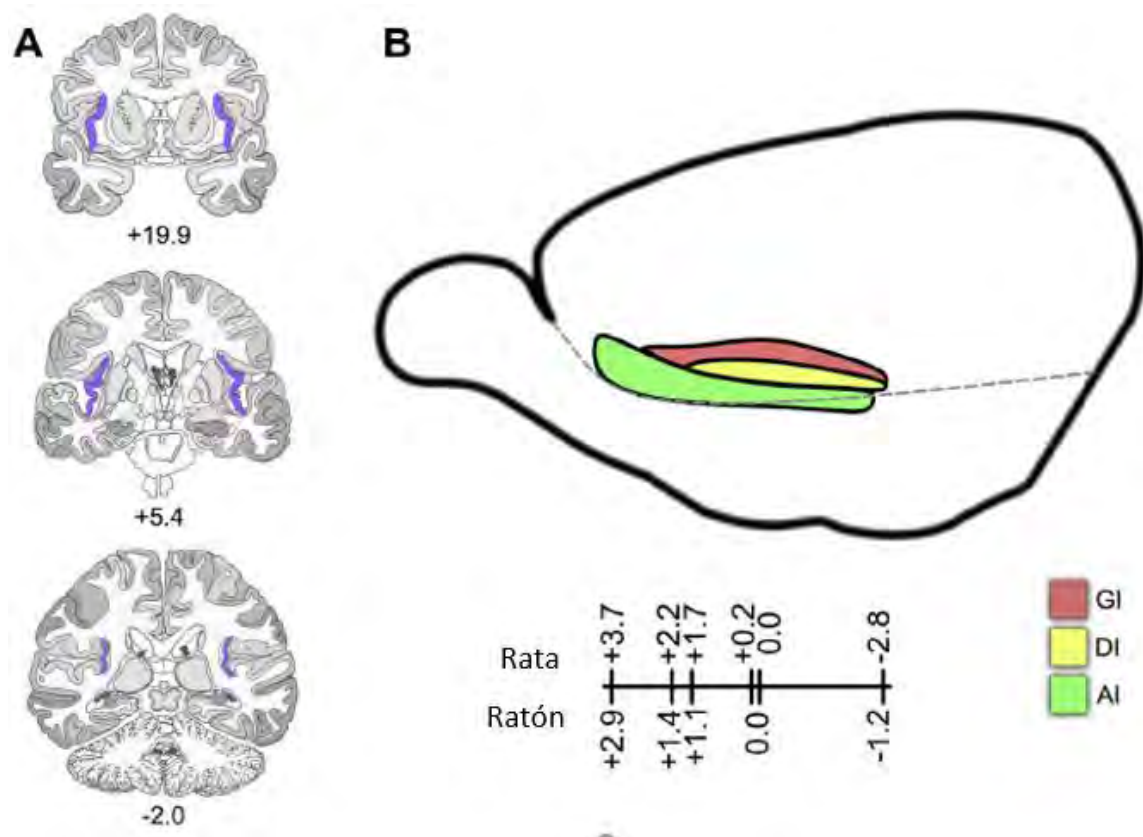


Figura 3. A) Localización de la CI en un corte coronal en humanos, con coordenadas desde la comisura anterior. B) Localización de la corteza insular en ratas y ratones con coordenadas desde bregma como 0, con sus subdivisiones: GI (Insula granular), DI (Insula disgranular), AI (Insula agranular) (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2014).

ORM Y TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

Con el fin de comprender los mecanismos neuronales subyacentes a las fases de la memoria de reconocimiento, se han realizado estudios en los que se administran antagonistas de los receptores glutamatergicos, los cuales, como se mencionó anteriormente, tienen un papel central en los procesos plásticos de la memoria. Entre los fármacos más utilizados están el ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (AP5), antagonista competitivo que se une a los receptores NMDA, o el fármaco 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX), antagonista competitivo de los receptores AMPA (Riedel, Platt y Micheau, 2003).

Se ha hallado que el bloqueo de los receptores AMPA mediante la infusión de CNQX en la corteza perirrinal, antes de la fase de muestra, impide la adquisición de dicha tarea, pues al evaluar la memoria a corto plazo (minutos después de la sesión de muestra) y a largo plazo (24 h después de la sesión de muestra), los sujetos no son capaces de diferenciar el objeto novedoso del familiar. Asimismo, la aplicación de CNQX en la corteza perirrinal antes de la sesión de prueba de la tarea de ORM impide la evocación de esta (Winters y Bussey, 2005; Banks, Warburton, Brown y Bashir, 2014).

Por otro lado, la inyección de AP5 en la corteza perirrinal después de la sesión de muestra del ORM no afecta la memoria de reconocimiento a corto plazo cuando esta es evaluada a los 5 o 20 minutos después de la adquisición (Warburton, Barker y Brown, 2013). De manera contraria, cuando el AP5 es infundido luego de la sesión de muestra y se evalúa la memoria 24 horas después, la memoria a largo plazo se ve disminuida, pues los animales no muestran preferencia por el objeto novedoso, con lo que se puede argumentar que el bloqueo de los receptores NMDA impide la consolidación de la tarea (Winters y Bussey, 2005; Winters, Saksida y Bussey, 2008).

HIPÓTESIS DE INTEGRACIÓN DE LA MEMORIA COMO ALTERNATIVA A LA HIPÓTESIS DE CONSOLIDACIÓN

La hipótesis de consolidación sostiene que la memoria se estabiliza luego de su adquisición con el paso del tiempo (McGaugh, 2000). Durante este lapso, la estabilización de la memoria es susceptible a diferentes fármacos amnésicos que la interrumpen, tales como los inhibidores de síntesis de proteínas (ISP) (O'connor y Adams, 2014), impidiendo el establecimiento a largo plazo de diferentes tipos de memorias. De manera general, se ha descrito que la inyección de ISP, ya sea de manera cerebral o sistémica, antes o después del entrenamiento, impide la retención a largo plazo (usualmente evaluada 24 horas después de la adquisición) (Dudai, 2004), y por tanto,

la consolidación. Además, a medida que aumenta el intervalo entre el entrenamiento y la administración de ISP, el efecto amnésico va disminuyendo (Davis y Squire, 1984), sugiriendo que existe un periodo específico donde la memoria es susceptible a dichos efectos amnésicos.

En contraposición a la hipótesis de consolidación, existe una hipótesis alternativa, llamada hipótesis de integración de la memoria, que explica los efectos amnésicos en términos de una memoria dependiente de estado (Gisquet-Verrier et al., 2015). La memoria dependiente de estado está definida como un fenómeno en el que la evocación de la memoria es posible solamente si el sujeto se encuentra bajo el mismo estado fisiológico que se presentó durante la adquisición (Jafari-Sabet, Mofidi y Attarian-Khosroshahi, 2018). De acuerdo con Gisquet-Verrier et al. (2015), la integración de la información (estado fisiológico) se incorpora al trazo de memoria mientras esta se encuentra activa y susceptible de ser modificada. Por el momento, el estado inducido durante este fenómeno se ha definido en términos de actividad neuronal (Overton, 1991), incluyendo la actividad de circuitos neuronales locales e incluso del estado general del sujeto.

La memoria dependiente de estado es un fenómeno del que se conoce desde principios del siglo XX y que fue demostrado experimentalmente primero por Girden y Culler (1937), en una serie de experimentos donde se condicionó la contracción de un músculo de la pierna de perros al sonido de una campana y encontraron que el condicionamiento bajo la administración de curare, antagonista de la acetilcolina, solo podía ser evocado bajo los mismos efectos del curare. A partir de ese hallazgo, la memoria dependiente de estado ha sido demostrada en gran variedad de tareas, como la evitación pasiva y condicionamiento clásico; en diversas especies, como con humanos, roedores, gatos, monos; y con gran cantidad de estados fisiológicos, como los producidos por fármacos, sueño, hormonas, entre otros (Overton, 1991; Radulovic, Jovasevic y Meyer, 2017).

Aunque no se tienen claramente definidas cuáles son las características específicas que subyacen al fenómeno de dependencia de estado, se cree que los cambios en el balance excitación/inhibición, como los ocasionados por la transmisión glutamatérgica, pueden ser uno de los mecanismos moleculares involucrados (Radulovic, Jovasevic y Meyer, 2017).

Gisquet-Verrier et al. en 2015 probaron la hipótesis de dependencia de estado usando la tarea de evitación pasiva. En esta tarea se coloca a los animales en una arena con dos compartimentos, uno claro y otro oscuro. Las ratas prefieren instintivamente el compartimento oscuro y por tanto, se aplica un estímulo aversivo cuando pasan a este; es decir, las ratas asocian el contexto oscuro con la consecuencia aversiva. Tanto en el entrenamiento como en la prueba se mide la latencia de los animales para pasar al compartimento oscuro, y se espera que la latencia en la prueba aumente con respecto al entrenamiento. En ese trabajo, los investigadores administraron cicloheximida, un ISP, después de la adquisición de la tarea de evitación pasiva, lo que impidió la consolidación de la memoria. Sin embargo, la administración de cicloheximida después de la adquisición y antes de la evocación, restableció la memoria aversiva. Es decir, estos datos proporcionan evidencia a favor de la hipótesis de integración de la memoria, donde un fallo en la memoria es debido a una discrepancia entre los estados experimentados por los sujetos durante el establecimiento y la evocación de la memoria; en contraste con la interrupción de los procesos de consolidación.

DEPENDENCIA DE ESTADO Y TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA

La relación entre las memorias dependientes de estado y los receptores glutamatérgicos ha sido poco estudiada. Se ha encontrado que la inducción de memorias estado-dependientes con morfina o litio puede ser reguladas por la actividad glutamatérgica. Por ejemplo, Zarrindast, Jafari-Sabet, Rezayat, Djahanguiri y Rezayof en 2006, indujeron una memoria dependiente de estado en una tarea de evitación pasiva mediante la inyección de morfina intracerebrovascular

antes del entrenamiento y antes de la prueba; posteriormente coadministraron antes de la prueba L-glutamato, un agonista de los receptores ionotrópicos de glutamato, o MK-801, antagonista de NMDA, encontrando que el agonista mejoraba la evocación, mientras que el antagonista la empeoraba. En un estudio similar, también usando la tarea de evitación pasiva, Rezayat et al., en 2010 provocaron una pobre ejecución de la tarea con una inyección de litio intraperitoneal después del entrenamiento, lo cual fue revertido con una segunda inyección de litio antes la prueba. De manera similar, la activación de los receptores NMDA en este experimento mejoró la memoria dependiente de estado en concentraciones bajas de litio, mientras que el bloqueo de los receptores provocó que los animales no ejecutaran correctamente la tarea. De tal forma que se sabe que los receptores glutamatérgicos pueden modular las memorias dependientes de estado inducidas por otros fármacos.

Por otro lado, existe literatura, aunque escasa, que muestra que algunos fármacos como fenciclidina, ketamina o MK-801, antagonistas de receptores NMDA, pueden generar memorias dependientes de estado en tareas de evitación pasiva y de condicionamiento operante (Ceretta et al., 2008; Jackson, Koek y Colpaert, 1992). Sin embargo, el papel de los receptores AMPA no ha sido estudiado de igual manera, y se desconoce si este fenómeno se puede extender a otros antagonistas y otras tareas, tales como el ORM.

DEPENDENCIA DE ESTADO EN ORM

Siguiendo la hipótesis de integración de la memoria, Osorio-Gómez et al. (aún no publicado) administraron anisomicina y 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB), ambos ISP, en la corteza insular después del entrenamiento del ORM. Se observó que la administración de estos ISP impide el establecimiento de esta tarea. No obstante, cuando administraron el fármaco

de nueva cuenta antes de la fase de prueba, la memoria se restableció, presuntamente por un fenómeno de memoria dependiente de estado.

De acuerdo con estos antecedentes con ISP, se conoce que estos fármacos amnésicos pueden generar memorias dependientes de estado, lo cual abre la posibilidad al uso de otros fármacos amnésicos, como los antagonistas de glutamato en el estudio de la memoria estado-dependiente. Sin embargo, cabe destacar que la temporalidad de acción de los fármacos puede ser un factor importante en la inducción de memorias dependientes de estado, ya que los inhibidores de síntesis de proteínas tienen un tiempo de acción mínimo de dos horas y una difusión máxima a las 3 horas en el cerebro (Wanisch y Wotjak, 2008), esto variando según el inhibidor usado y la vía de administración (Davis y Squire, 1984). De manera contraria, se ha descrito que los antagonistas glutamatérgicos tienen una temporalidad menor a los inhibidores de síntesis de proteínas, ya que el CNQX tiene un efecto de inhibición máximo alrededor de los 20 minutos después de la administración y un retorno a línea basal alrededor de los 90 minutos (Taylor, Ohline, Moss, Ulrich y Abraham, 2016), mientras que el AP5 ha mostrado un efecto inhibitorio que regresa a la línea basal de actividad alrededor de los 80 y 100 minutos después de su administración (Mizuno, Kanazawa y Sakurai, 2001).

JUSTIFICACIÓN

Aunque existen reportes de que el bloqueo de la síntesis de proteínas y la inactivación de los receptores glutamatérgicos en la CI previene la formación de memorias de reconocimiento (Balderas et al., 2008; Bermúdez-Rattoni, 2014; Guzmán-Ramos, Osorio-Gómez, Moreno-Castillo y Bermúdez-Rattoni, 2010), no existen estudios donde se evalúe el papel de los receptores glutamatérgicos en la CI en la consolidación y evocación de la tarea de ORM.

De igual manera, no existen investigaciones que estudien la inducción de una memoria de reconocimiento dependiente de estado con antagonistas de los receptores NMDA y AMPA. Los datos obtenidos podrían ayudar a ampliar el conocimiento sobre la relación entre el glutamato y la memoria dependiente de estado, así como a repensar el papel de los fármacos amnésicos en las diferentes etapas de la memoria.

A través del presente estudio se propone evaluar la inducción de una memoria de reconocimiento dependiente de estado mediante el uso de antagonistas de los receptores NMDA y AMPA. Asimismo, se determinará si el tiempo de acción de los antagonistas de glutamato es una variable que puede afectar la inducción de una memoria dependiente de estado. El presente proyecto permite dilucidar si los antagonistas de NMDA y AMPA producen amnesia o generan una memoria de reconocimiento dependiente de estado. Los resultados obtenidos pueden ayudar a entender mejor el proceso de la memoria y plantear hipótesis alternativas sobre el papel de los fármacos amnésicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar si es posible inducir una memoria dependiente de estado mediante la administración en la corteza insular de los antagonistas glutamatérgicos AP5 y CNQX en una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Objetivos particulares

Evaluar si el antagonista glutamatérgico AP5 interfiere con la consolidación de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Evaluar si el antagonista glutamatérgico AP5 interfiere con la evocación de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Evaluar si el antagonista glutamatérgico CNQX interfiere con la consolidación de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Evaluar si el antagonista glutamatérgico CNQX interfiere con la evocación de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Evaluar si el antagonista glutamatérgico AP5 puede generar una memoria dependiente de estado en una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Evaluar si el antagonista glutamatérgico CNQX puede de generar una memoria dependiente de estado en una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Conocer el tiempo en que la inyección del antagonista AP5 no tiene efecto luego de la sesión de muestra de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos.

Evaluar si el incremento temporal del efecto del antagonista AP5 luego de la sesión de prueba de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos es capaz de generar una memoria dependiente de estado.

Evaluar si el incremento temporal del efecto del antagonista CNQX luego de la sesión de prueba de una tarea de memoria de reconocimiento de objetos es capaz de generar una memoria dependiente de estado.

HIPÓTESIS

La administración del antagonista glutamatérgico AP5 en la CI impide la consolidación de la tarea de ORM.

La administración del antagonista glutamatérgico AP5 en la CI impide la evocación de la tarea de ORM.

La administración del antagonista glutamatérgico CNQX en la CI impide la consolidación de la tarea de ORM.

La administración del antagonista glutamatérgico CNQX en la CI impide la evocación de la tarea de ORM.

La administración del antagonista glutamatérgico AP5 en la CI genera una memoria dependiente de estado en la tarea de ORM.

La administración del antagonista glutamatérgico CNQX en la CI genera una memoria dependiente de estado en la tarea de ORM.

Existe un tiempo en el que el antagonista glutamatérgico AP5 no tiene efecto sobre la consolidación cuando es administrado luego de la sesión de muestra de la tarea de ORM.

El aumento del tiempo de acción del antagonista AP5 en la CI genera una memoria dependiente de estado en la tarea de ORM.

El aumento del tiempo de acción del antagonista CNQX en la CI genera una memoria dependiente de estado en la tarea de ORM.

MATERIALES Y MÉTODO

Se usaron ratas macho adultas de la cepa Wistar, proporcionadas por el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, con un peso entre 280 y 300 g al inicio de los experimentos. Las ratas fueron mantenidas individualmente en cajas de acrílico con agua y comida *ad libitum*, bajo un ciclo de

luz-oscuridad de 12 horas. Los protocolos experimentales se llevaron a cabo durante la fase de luz.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (70 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y mediante cirugía estereotáxica se les implantó bilateralmente con cánulas guía de 9mm de largo dirigidas a la corteza insular, con coordenadas respecto a bregma: anteroposterior +1.2 mm, lateral \pm 5.5 mm y dorsoventral -3mm (Paxinos y Watson, 1998). Se colocaron estiletes en las cánulas para evitar su obstrucción. Las ratas tuvieron una semana de recuperación.

Las microinyecciones fueron administradas con micro-jeringas Hlamilton (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) de 10 μ L conectadas mediante tubería de acrílico a una bomba de microinfusión (Cole Parmer instruments, Illinois, US). El volumen inyectado fue de un microlitro (0.5 μ L/min), manteniendo la aguja por un minuto más para la completa difusión. Los fármacos utilizados fueron ácido DL-2-amino-5-fosfonovalérico (AP5, 10mg/mL, Guzmán-Ramos, Osorio-Gómez, Moreno-Castilla y Bermúdez-Rattoni, 2010) (Tocris Bioscience; Bristol, UK); o hidrato disódico 6-cyano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX, 1mg/mL, Osorio-Gómez, Guzmán-Ramos y Bermúdez-Rattoni, 2016) (Sigma Aldrich, Missouri, US) los cuales fueron disueltos en solución salina (SS, 0.9% peso/vol). El protocolo de inyección de los fármacos será descrito más adelante.

La tarea de reconocimiento de objetos se llevó a cabo en una caja de madera con pintura gris de 40×40×60cm con aserrín, la cual fue limpiada antes de cada ensayo. Los objetos usados fueron focos blancos de cristal (6 cm de diámetro y 11 cm de largo) y frascos transparentes (5.5 cm de diámetro y 5 cm de alto) fijados con Velcro a las dos esquinas posteriores del piso de la caja. Los objetos fueron limpiados con etanol al 70% (vol/vol) antes de cada exploración para evitar claves olfatorias.

Al finalizar los protocolos conductuales, se verificó la correcta implantación de las cánulas. Para ello, los animales fueron inyectados i.p. con una sobredosis de pentobarbital y se perfundieron con solución salina al 0.9%, posteriormente se extrajo el cerebro, el cual fue almacenado en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PBS) y después en una solución sacarosa al 30% en PBS. Finalmente, el cerebro fue cortado en rebanadas de 40 micras, fijado y teñido con violeta de cresilo, los cortes fueron observados mediante microscopía óptica.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Las ratas fueron llevadas desde el *vivarium* al cuarto de conducta por tres días consecutivos, donde estuvieron durante una hora en sus cajas en un cuarto a 19°C con ruido blanco de fondo, luego fueron introducidas a las arenas de conducta por 10 minutos sin ningún objeto con el fin de habituarlas a la arena de exploración y evitar efectos derivados del estrés.

Durante el cuarto día se llevó la sesión de entrenamiento. Las ratas fueron llevadas al cuarto y permanecieron en su caja por una hora, posteriormente fueron introducidas en las arenas de exploración por cinco minutos, durante los cuales exploraron libremente dos objetos idénticos. Se grabaron las conductas de exploración mediante videocámaras para posteriormente contabilizar el tiempo de exploración. Inmediatamente después de los cinco minutos de exploración, se les administró vehículo (solución salina), AP5 o CNQX luego de lo cual regresaron a sus cajas. Posterior al entrenamiento, las ratas permanecieron durante una hora en el cuarto.

Al quinto día se llevó a cabo la sesión de prueba, donde las ratas estuvieron una hora en el cuarto de conducta y posteriormente fueron inyectadas con SS, AP5 o CNQX según el grupo experimental al que pertenecían. Quince minutos después fueron introducidas en las cajas de exploración con un objeto idéntico al de la fase de entrenamiento y otro distinto para explorarlos

libremente. Esta conducta de exploración también fue grabada mediante videocámara para su análisis posterior. Se realizó un contrabalanceo de las condiciones experimentales: Los objetos usados fueron dispuestos de manera aleatoria en las cuatro arenas utilizadas, de manera que los objetos novedosos nunca fueron únicamente los focos o los frascos. De igual manera, todos los grupos fueron aleatoriamente expuestos a las cuatro arenas de la tarea, para evitar sesgos de lugar.

Protocolo experimental: Administración de AP5, CNQX o solución salina después del entrenamiento y antes de la prueba.

Los grupos utilizados fueron: solución salina después de la sesión de muestra y antes de la sesión de prueba (SS-SS, n= 7), solución salina después de la muestra y AP5 antes de la sesión de prueba (SS-AP5, n= 6), AP5 después de la sesión de muestra y solución salina antes de la sesión de prueba (AP5-SS, n= 7), AP5 después de la sesión de muestra y AP5 antes de la sesión de prueba (AP5-AP5, n= 6), CNQX después de la muestra y solución salina antes de la sesión de prueba (CNQX-SS, n= 6), solución salina después de la muestra y CNQX antes de la sesión de prueba (SS-CNQX, n=7) y CNQX después de la sesión de muestra y CNQX antes de la sesión de prueba (CNQX-CNQX, n=7) (Figura 4).

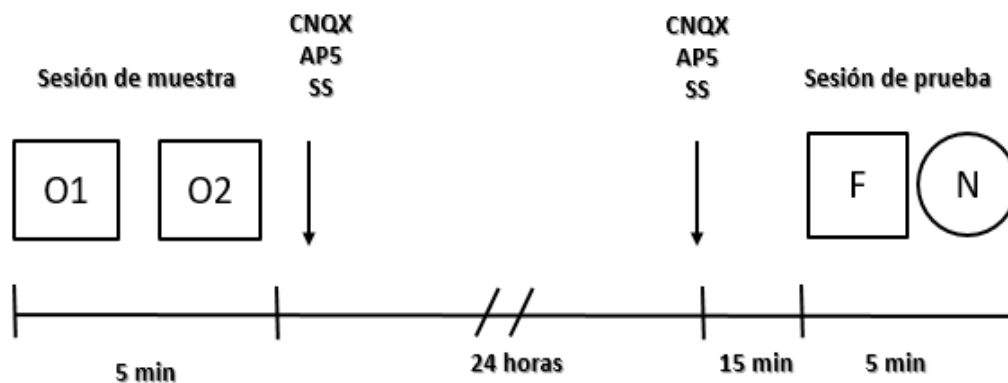


Figura 4. Esquema representativo del protocolo experimental de la tarea de ORM donde se administró solución salina (SS), AP5 (10mg/mL) o CNQX (1mg/mL) inmediatamente después de la sesión de muestra en la que se presentan dos objetos idénticos (O1 y O2) y quince minutos antes de la sesión de prueba, donde se presenta un objeto familiar (F) y un objeto novedoso (N).

Protocolo experimental: Administración de AP5, CNQX o solución salina después del entrenamiento, 60 minutos después y antes de la prueba.

Con el objetivo de incrementar el tiempo de acción de los fármacos utilizados, se realizó el siguiente protocolo: inmediatamente después de la sesión de entrenamiento se administró SS, AP5 o CNQX; pasados 60 minutos se administró de nuevo SS, AP5 o CNQX; finalmente, el día de la prueba se administró SS, AP5 o CNQX 15 minutos antes de la sesión de prueba, todo esto dependiendo de los grupos.

Los grupos experimentales fueron: solución salina después de la sesión de muestra, solución salina 60 minutos después y solución salina antes de la sesión de prueba (SS-SS-SS, n= 6); solución salina después de la sesión de muestra, AP5 60 minutos después y solución salina antes de la sesión de prueba (SS-AP5-SS, n= 7); solución salina después de la sesión de muestra, AP5 60 minutos después y AP5 antes de la sesión prueba (SS-AP5-AP5, n= 7); AP5 después de la sesión de muestra, AP5 60 minutos después y solución salina antes de la sesión de prueba (AP5-AP5-SS, n= 7); AP5 después de la sesión de muestra, AP5 60 minutos después y AP5 antes de la sesión de prueba (AP5-AP5-AP5, n= 7); solución salina después de la sesión de muestra, solución salina 60 minutos después y CNQX antes de la sesión de prueba (SS-SS-CNQX, n= 9); CNQX después de la sesión de muestra, CNQX 60 minutos después y solución salina antes de la sesión de prueba (CNQX-CNQX-SS, n= 6); y CNQX después de la sesión de muestra, CNQX 60 minutos después y CNQX antes de la sesión de prueba (CNQX-CNQX-CNQX, n= 11) Figura 5.

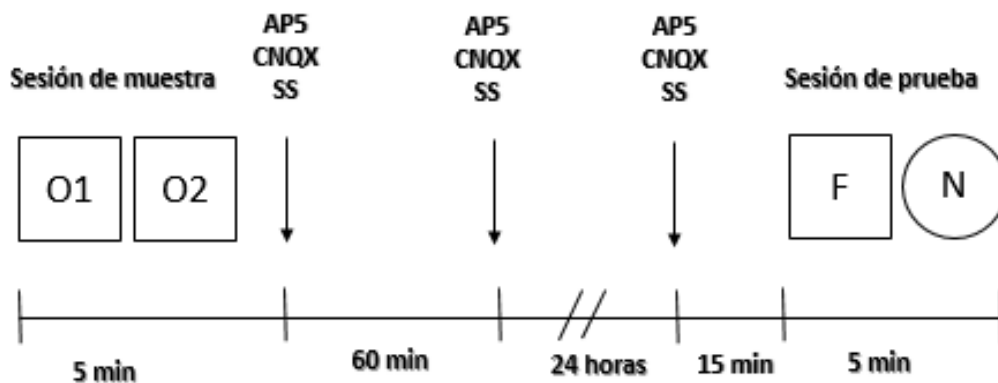


Figura 5. Esquema representativo del protocolo experimental de la tarea de ORM donde se administró SS, AP5 (10mg/mL) o CNQX (1mg/mL), inmediatamente después de la sesión de muestra en la que se presentan dos objetos idénticos (O1 y O2), de nuevo 60 minutos después del entrenamiento, y una tercera vez quince minutos antes de la sesión de prueba, donde se presenta un objeto familiar (F) y un objeto novedoso (N).

Protocolo experimental: Administración de AP5 o solución salina después del entrenamiento, 120 minutos después y antes de la prueba.

Para la tercer serie de experimentos, se inyectó solución salina o AP5 justo después de la exploración, 120 minutos después de que los animales exploraran y 15 minutos antes de la prueba según los siguientes grupos: solución salina después de la sesión de muestra, 120 minutos después y solución salina antes de la sesión de prueba (SS-SS-SS, n= 7); solución salina después de la sesión de muestra, AP5 120 minutos después y solución salina antes de la sesión de prueba (SS-AP5-SS, n= 7); solución salina después de la sesión de muestra, AP5 120 minutos después y AP5 antes de la sesión de prueba (SS-AP5-AP5, n= 8); AP5 después de la muestra, solución salina 120 minutos después y AP5 antes de la sesión de prueba (AP5-SS-AP5, n= 7); AP5 después de la sesión de muestra, AP5 120 minutos después y solución salina antes de la sesión de prueba (AP5-AP5-SS, n= 7); y AP5 después de la sesión de muestra, AP5 120 minutos después y AP5 antes de la sesión de prueba (AP5-AP5-AP5, n= 7) Figura 6.

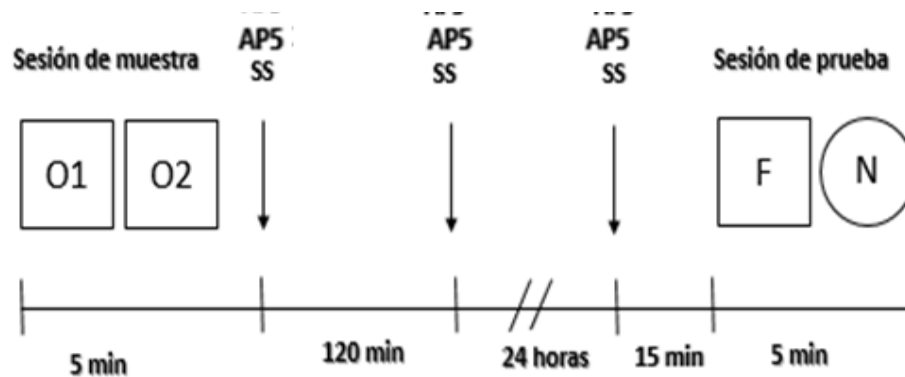


Figura 6. Esquema representativo del protocolo experimental de la tarea de ORM donde se administró SS o el fármaco AP5 (10 mg/mL), inmediatamente después de la sesión de muestra en la que se presentan dos objetos idénticos (O1 y O2), de nuevo 120 minutos después, y una tercera vez quince minutos antes de la sesión de prueba, donde se presenta un objeto familiar (F) y un objeto novedoso (N).

Para el análisis de los videos se contabilizó el tiempo de exploración para cada objeto, por parte de un experimentador ciego a las condiciones experimentales de los animales. La exploración de un objeto fue considerada como el toque del objeto con la nariz, o bien colocarla a 1 cm o menos de distancia. Colocar las patas encima, morder o girar cerca del objeto no fue considerado como exploración.

Se usó un índice de reconocimiento expresado como el tiempo de exploración en cada uno de los objetos entre el tiempo total de exploración de los dos objetos (Objeto X / (Objeto X + Objeto Y)). En este sentido, un índice del 0.5 indica que no hay preferencia por ninguno de los dos objetos, mientras un índice de reconocimiento significativamente más alto que 0.5 demuestra preferencia por alguno de los dos objetos. Todos los tiempos de exploración durante la fase de entrenamiento fueron analizados para garantizar que las ratas no mostraran una preferencia inicial por alguno de los dos objetos, de lo contrario fueron eliminadas de análisis posteriores.

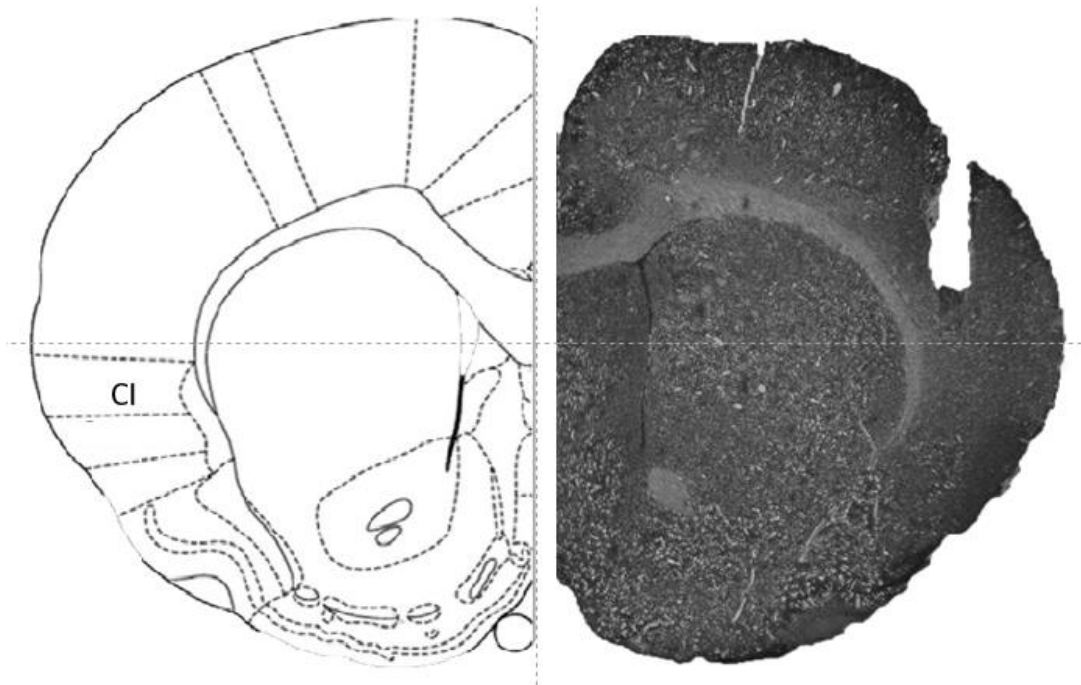
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se obtuvieron las medias y errores estándar de los índices de exploración para los distintos grupos. Se probó mediante una prueba t de Student de una sola muestra si la media de los índices para cada objeto era distinta del azar (0.5), también se comparó el índice de exploración de los dos objetos por medio de una prueba t de Student para dos muestras independientes. Asimismo, se compararon los índices de exploración para el objeto novedoso entre los grupos experimentales mediante ANOVA de una vía y un análisis post-hoc de comparaciones múltiples de Fisher y finalmente se comparó el tiempo total de exploración durante la prueba (OF + ON) entre los grupos mediante una prueba ANOVA de una vía, con un análisis post-hoc de comparaciones múltiples de Fisher. Un valor de $p < 0.05$ se tomó como estadísticamente significativo para todos los análisis. Para los análisis estadísticos se usó el software Graphpad® Prism® versión 6.

RESULTADOS

HISTOLOGÍA

Los lugares de canulación se verificaron mediante microscopía óptica para la CI. Aquellos animales cuyos sitios de canulación fueron incorrectos se excluyeron de análisis posteriores.



Fotografía representativa de las muestras histológicas mediante las cuales se verificó el lugar donde fueron colocadas las cánulas por medio de cirugía estereotáxica. (Diagrama modificado de Parkes, S.L., De la Cruz, V., Bermúdez-Rattoni, F., Coutureau, E. y Ferreira, G., 2014).

RESULTADOS EXPERIMENTO 1: ADMINISTRACIÓN DE AP5, CNQX O SOLUCIÓN SALINA DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO Y ANTES DE LA PRUEBA.

En la sesión de muestra, los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en el índice de reconocimiento de ambos objetos con respecto al azar (0.5) (Objeto 1: $t_{(42)} = 0.112$, $p > 0.05$, Objeto 2: $t_{(42)} = 0.112$, $p > 0.05$), por lo tanto, no hubo preferencia por alguno de los dos objetos idénticos (*Figura 7(A)*). En la sesión de prueba (*Figura 7(B)*) el grupo inyectado con solución salina en ambos momentos (SS-SS) ($t_{(6)} = 3.154$, $p < 0.05$), así como el grupo inyectado con solución salina y AP5 (SS-AP5) ($t_{(5)} = 2.936$, $p < 0.05$), tuvieron un índice de reconocimiento mayor al azar para el objeto novedoso, mientras los grupos inyectados con AP5 y solución salina

(AP5-SS) ($t_{(6)} = 0.722$, $p > 0.05$), así como con AP5 en ambos momentos (AP5-AP5) ($t_{(5)} = 0.726$, $p > 0.05$) no mostraron diferencias con respecto al azar en el índice para el objeto novedoso. Por otro lado, el grupo inyectado con CNQX y solución salina (CNQX-SS) ($t_{(5)} = 3.903$, $p < 0.05$) tuvo un índice de reconocimiento mayor al azar para el objeto novedoso (ON) durante la prueba y, por tanto, preferencia por ese objeto, mientras el grupo inyectado con solución salina y CNQX (SS-CNQX) ($t_{(6)} = 0.415$, $p > 0.05$) y el grupo inyectado con CNQX en ambos momentos (CNQX-CNQX) ($t_{(6)} = 0.401$, $p > 0.05$) no mostraron un índice de reconocimiento para el ON significativamente diferente del azar. El análisis de varianza mostró que los índices de reconocimiento para el objeto novedoso (ON) fueron diferentes entre los grupos ($F_{(6,39)} = 3.080$, $p < 0.05$), y el análisis post-hoc mostró que el índice para este mismo objeto (ON) del grupo SS-SS fue distinto con respecto a los grupos AP5-SS ($p < 0.05$), AP5-AP5 ($p < 0.01$) y SS-CNQX ($p < 0.05$). Por otro lado, el análisis de varianza no mostró diferencias en los tiempos totales de exploración entre los grupos, para la sesión de prueba ($F_{(6,40)} = 0.632$, $p > 0.05$). La media y el error estándar de los tiempos de exploración para cada grupo fueron los siguientes: SS-SS = 13.75 ± 2.32 s, SS-AP5 = 17.05 ± 4.14 s, AP5-SS = 12.43 ± 2.48 s, AP5-AP5 = 17.47 ± 5.56 s, CNQX-SS = 11.73 ± 2.23 s, CNQX-CNQX = 14.40 ± 3.70 s y SS-CNQX = 13.75 ± 1.88 s.

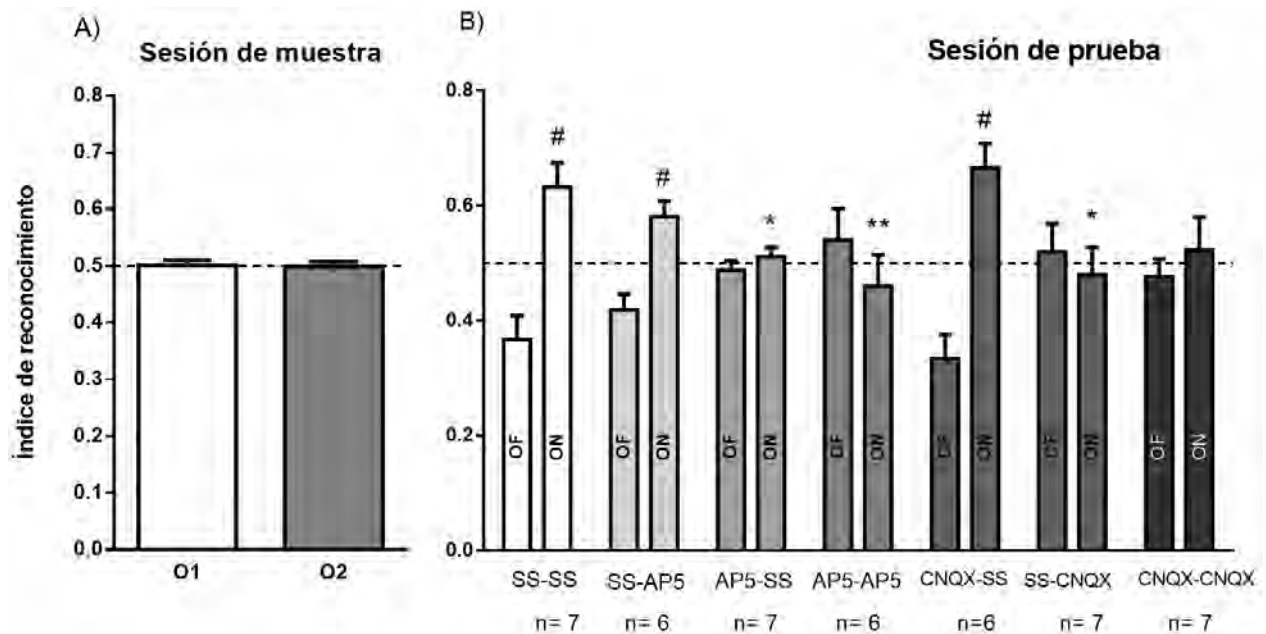


Figura 7. Reconocimiento de objetos modulado por la inyección de fármacos después de la adquisición y antes de la evocación. A) Índice de reconocimiento con error típico para la sesión de muestra en el primer experimento de ORM (figura 4). B) Índice de reconocimiento con error típico para la sesión de prueba en el primer experimento de ORM (figura 4). La línea punteada representa el azar (0.5). # Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al azar. * Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS. ** Representa $p < 0.01$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS.

RESULTADOS EXPERIMENTO 2: ADMINISTRACIÓN DE AP5 O SOLUCIÓN SALINA DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO, 60 MINUTOS DESPUÉS Y ANTES DE LA PRUEBA.

En la sesión de muestra del segundo experimento (figura 8(A)), los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en el índice de reconocimiento de ambos objetos con respecto al azar (0.5) (Objeto 1: $t_{(36)} = 0.497$, $p > 0.05$, Objeto 2: $t_{(36)} = 0.497$, $p > 0.05$) por lo tanto, no hubo preferencia por alguno de los dos objetos idénticos.

Durante la sesión de prueba del segundo experimento (*figura 8(B)*) el grupo inyectado con solución salina en los tres momentos (SS-SS-SS) ($t_{(5)} = 3.631$, $p < 0.05$) así como el grupo inyectado con AP5 también en los tres momentos (AP5-AP5-AP5) ($t_{(6)} = 4.473$, $p < 0.05$) mostraron un índice de reconocimiento mayor al 0.05 para el ON. Por otra parte, el grupo inyectado con solución salina, AP5 y solución salina (SS-AP5-SS) ($t_{(6)} = 0.382$, $p > 0.05$) y el grupo inyectado con solución salina, AP5 y AP5 (SS-AP5-AP5) ($t_{(6)} = 0.655$, $p > 0.05$), no mostraron una diferencia significativa en el índice de reconocimiento con respecto al azar.

El análisis de varianza mostró que hubo diferencias significativas en el índice de reconocimiento para el ON entre los grupos ($F_{(4,29)} = 3.351$, $p < 0.05$), mientras el análisis post hoc reveló que el grupo que recibió solución salina en los tres momentos (SS-SS-SS) tuvo diferencias con respecto al grupo inyectado con solución salina, AP5 y solución salina (SS-AP5-SS) ($p < 0.05$) así como con respecto al grupo el grupo inyectado con solución salina, AP5 y AP5 (SS-AP5-AP5) ($p < 0.05$) y el grupo inyectado con AP5, AP5 y solución salina (AP5-AP5-SS) ($p < 0.05$).

El análisis de varianza mostró que hubo no hubo diferencias en el tiempo total de exploración entre los grupos en la sesión de prueba según el análisis de varianza ($F_{(5,44)} = 0.520$, $p > 0.05$). La media y error estándar de los tiempos de exploración para cada grupo fueron los siguientes: SS-SS-SS = 14.78 ± 3.06 s, SS-AP5-SS = 16.29 ± 3.70 s, SS-AP5-AP5 = 11.08 ± 2.63 s, AP5-AP5-SS = 13.34 ± 2.61 s y AP5-AP5-AP5 = 17.34 ± 3.79 s.

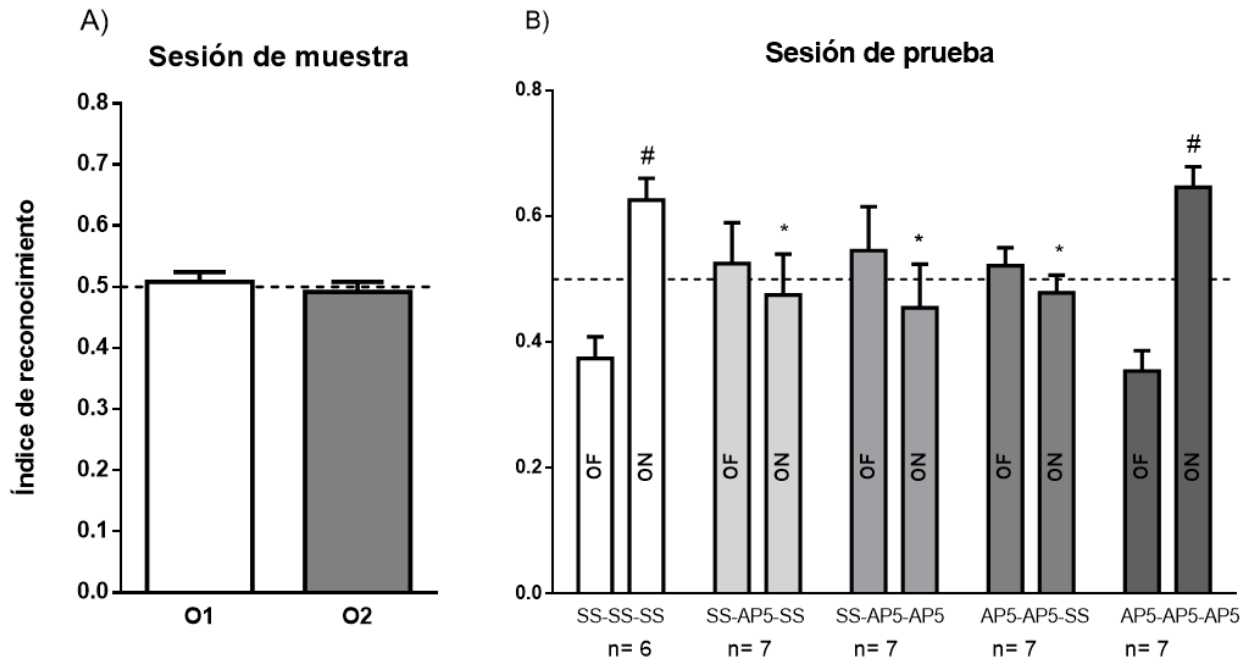


Figura 8. Reconocimiento de objetos modulado por la doble inyección de AP5, con 60 minutos de diferencia, de fármacos tras la adquisición y antes de la evocación. A) Índice de reconocimiento con error típico para la sesión de muestra en el segundo experimento de ORM con doble inyección de AP5 o Solución salina con diferencia de 60 minutos y una tercera quince minutos previos a la prueba de memoria (figura 5). B) Índices de reconocimiento con error típico para la sesión de prueba en el segundo experimento de ORM (figura 5). La línea punteada representa el azar (0.5). # Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al azar. * Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS. ** Representa $p < 0.01$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS.

RESULTADOS EXPERIMENTO 3: ADMINISTRACIÓN DE CNQX O SOLUCIÓN SALINA DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO, 60 MINUTOS DESPUÉS Y ANTES DE LA PRUEBA.

Para la sesión de muestra del tercer experimento (Figura 9(A)), los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en la exploración de ambos objetos idénticos, por lo tanto,

no hubo preferencia por alguno de los dos objetos en esta sesión del experimento (Objeto 1: $t_{(32)} = 1.093$, $p > 0.05$, Objeto 2: $t_{(32)} = 1.093$, $p > 0.05$).

Durante la prueba del tercer experimento (*Figura 9(B)*), el grupo inyectado con solución salina en los tres momentos (SS-SS-SS)($t_{(10)} = 4.044$, $p < 0.05$) así como el grupo inyectado con CNQX, también en los tres momentos (CNQX-CNQX-CNQX)($t_{(10)} = 2.891$, $p < 0.05$), mostraron un índice de reconocimiento mayor al 0.5 para el ON, por lo que tuvieron preferencia por ese objeto sobre el familiar (OF), mientras los grupos inyectados con solución salina, solución salina y CNQX (SS-SS-CNQX)($t_{(8)} = 0.722$, $p > 0.05$) y con CNQX, CNQX y solución salina (CNQX-CNQX-SS)($t_{(5)} = 0.355$, $p > 0.05$) no tuvieron un índice de reconocimiento mayor al azar para el ON.

El análisis de varianza no mostró diferencias entre los grupos con respecto al índice de reconocimiento del objeto novedoso (ON) ($F_{(3,27)} = 3.128$, $p > 0.05$). Por otra parte, el análisis de varianza no mostró diferencias en cuanto al tiempo total de exploración de los objetos familiar y novedoso ($F_{(3,32)} = 0.976$, $p > 0.05$). La media y error estándar de los tiempos de exploración para cada grupo fueron los siguientes: SS-SS-SS = 18.26 ± 3.96 s, SS-SS-CNQX = 19.69 ± 3.76 s, CNQX-CNQX-SS = 14.41 ± 3.52 s y CNQX-CNQX-CNQX = 19.60 ± 4.06 s.

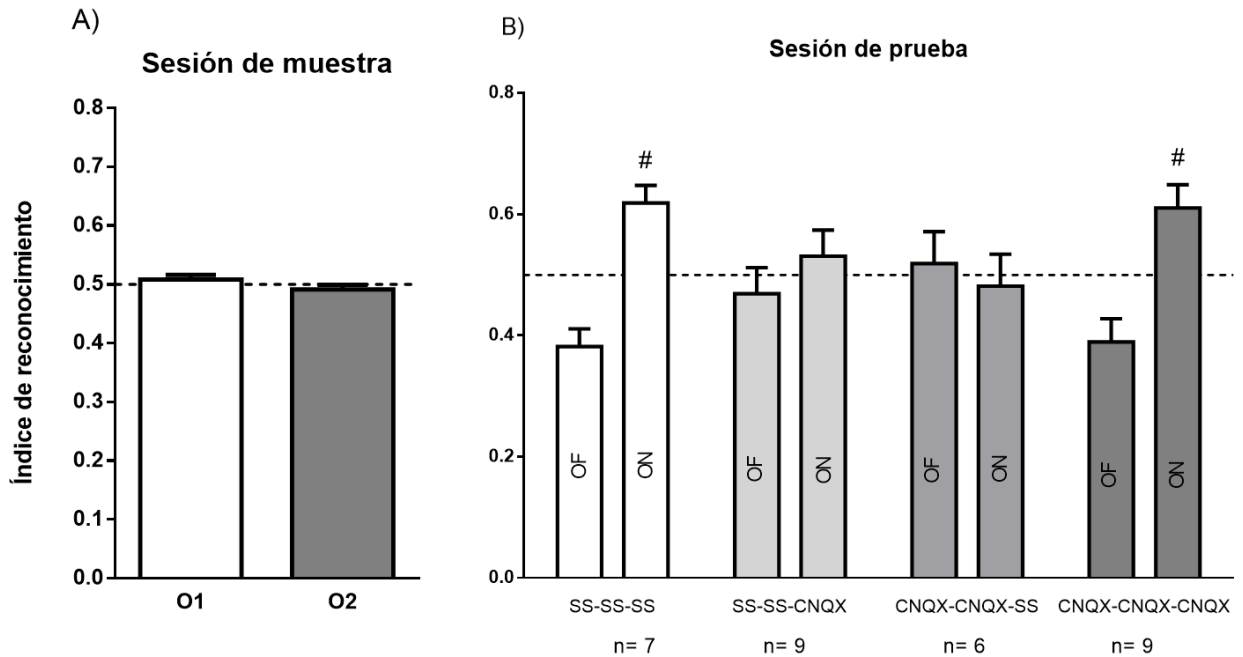


Figura 9. Memoria de reconocimiento modulada por la doble inyección, con 60 minutos de diferencia, de CNQX tras la adquisición y antes de la evocación. A) Índice de reconocimiento con error típico para la sesión de muestra en el tercer experimento de ORM con doble inyección de CNQX o solución salina con diferencia de 60 minutos (figura 5). B) Índices de reconocimiento con error típico para la sesión de prueba en el segundo experimento de ORM (figura 5). La línea punteada representa el azar (0.5). # Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al azar. * Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS. ** Representa $p < 0.01$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS-SS.

RESULTADOS EXPERIMENTO 4: ADMINISTRACIÓN DE AP5 O SOLUCIÓN SALINA DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO, 120 MINUTOS DESPUÉS Y ANTES DE LA PRUEBA.

Los análisis estadísticos no mostraron diferencia para el índice de reconocimiento en la sesión de muestra con respecto al azar (Objeto 1: $t_{(39)} = 0.513$, $p > 0.05$, Objeto 2: $t_{(39)} = 0.513$, $p > 0.05$)(Figura 10(A)) y por tanto no hubo preferencia por alguno de los dos objetos idénticos.

En cuanto al índice de reconocimiento para la sesión de prueba (*Figura 10(B)*), el grupo inyectado con solución salina en los tres momentos (SS-SS-SS) ($t_{(6)} = 4.526$, $p < 0.05$), así como el grupo inyectado con solución salina, AP5 y AP5 (SS-AP5-AP5) ($t_{(7)} = 4.396$, $p < 0.05$) y el grupo inyectado con solución salina, AP5 y solución salina (SS-AP5-SS) ($t_{(6)} = 4.420$, $p < 0.05$), tuvieron un índice de exploración mayor para el ON, y por tanto, preferencia por ese objeto, mientras los grupos inyectados con AP5, solución salina y AP5 (AP5-SS-AP5) ($t_{(6)} = 1.194$, $p > 0.05$), con AP5, AP5 y solución salina (AP5-AP5-SS) ($t_{(6)} = 0.047$, $p > 0.05$), y el grupo inyectado con AP5 en los tres momentos (AP5-AP5-AP5) ($t_{(6)} = 0.329$, $p > 0.05$), no mostraron un índice de reconocimiento mayor que el azar para el ON.

El análisis de varianza mostró que existieron diferencias en el índice de reconocimiento del objeto novedoso entre los grupos ($F_{(5,37)} = 5.056$, $p < 0.01$). El análisis post hoc mostró que hubo diferencias en cuanto a la exploración del ON entre el grupo inyectado con solución salina en los tres momentos (SS-SS-SS) y el grupo inyectado con AP5, solución salina y AP5 (AP5-SS-AP5) ($p < 0.01$), así como con el grupo inyectado con AP5, AP5 y solución salina (AP5-AP5-SS) ($p < 0.05$) y el grupo inyectado con AP5 en los tres momentos (AP5-AP5-AP5) ($p < 0.05$).

Por otra parte, el tiempo total de exploración para la sesión de prueba (*Figura 10(B)*) no fue diferente entre los grupos ($F_{(4,24)} = 0.825$, $p > 0.05$). La media y errores estándar de los tiempos de exploración para cada grupo fueron los siguientes: SS-SS-SS= 26.45 ± 4.63 s, SS-AP5-AP5= 17.75 ± 3.73 s, AP5-SS-AP5= 11.29 ± 1.58 s, AP5-AP5-SS= 26.33 ± 4.98 , AP5-AP5-AP5= 23.71 ± 6.09 s y SS-AP5-SS= 18.68 ± 3.76 s.

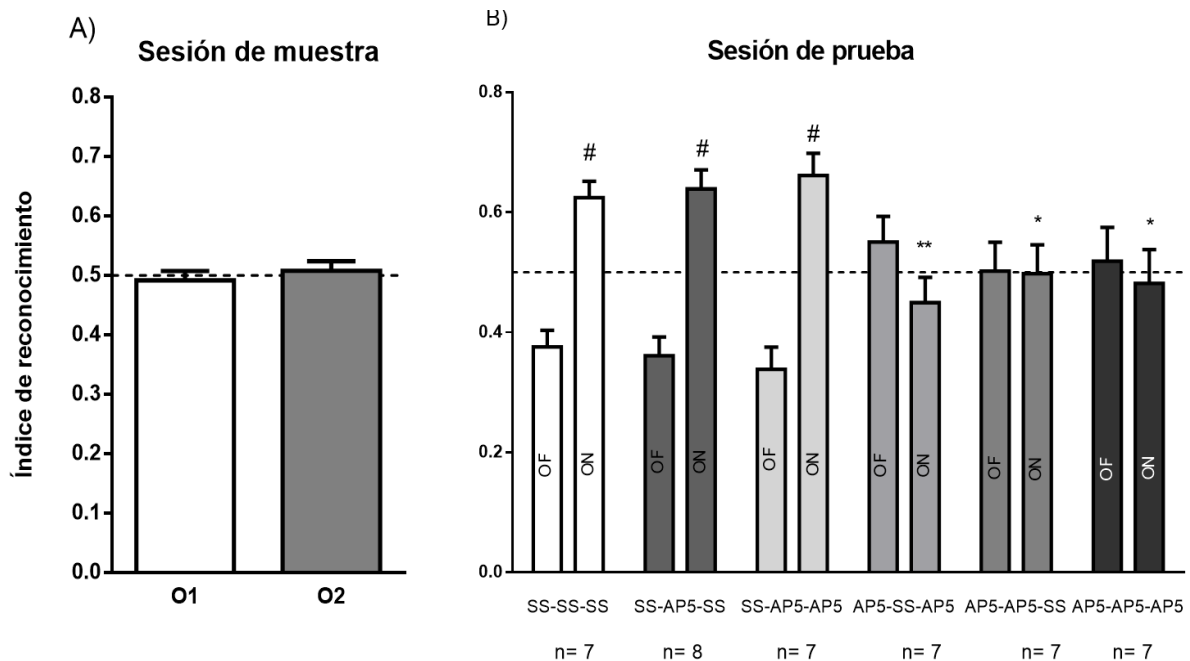


Figura 10. Memoria de reconocimiento modulada por la doble inyección, con 120 minutos de diferencia, de AP5 tras la adquisición y antes de la evocación A) Índice de reconocimiento, con error típico, para la sesión de muestra en el tercer experimento de ORM con doble inyección de AP5 o solución salina con diferencia de 120 minutos y una tercera quince minutos previos a la prueba de memoria (figura 6). B) Índices de reconocimiento con error típico para la sesión de prueba en el segundo experimento de ORM (figura 6). La línea punteada representa el azar (0.5). # Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al azar. * Representa $p < 0.05$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS. ** Representa $p < 0.01$ en la diferencia con respecto al ON del grupo SS-SS-SS.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió a la CI, región que ha sido escasamente involucrada en la formación de la memoria de reconocimiento, en contraposición al grueso del cuerpo teórico que asocia a la memoria de reconocimiento con áreas como la corteza perirrinal y el hipocampo (Brown y Aggleton, 2001). Gracias a los resultados aquí presentados, la CI adquiere un papel más importante en la formación y recuperación de la memoria de reconocimiento.

Los datos obtenidos muestran que la administración del antagonista de receptores NMDA, el fármaco AP5, impide la consolidación de la memoria de reconocimiento como se había reportado anteriormente (Winters y Bussey, 2005; Winters et al., 2008). Asimismo, se observó que aun cuando el AP5 es administrado pasados 60 minutos desde que se adquirió la tarea, este impide la consolidación de la memoria de reconocimiento. Este fenómeno había sido observado previamente en la tarea de evitación pasiva, en la que se inyectó AP5 en la corteza entorrinal e hipocampo 60 minutos después de la adquisición (Izquierdo et al., 1997), así como en la interrupción de la consolidación del condicionamiento de aversión a los sabores al bloquear los receptores NMDA en la CI tras 60 minutos desde la adquisición (Gutiérrez, Hernández-Echeagaray, Ramírez-Amaya y Bermúdez-Rattoni, 1999). En ambos estudios la formación de la memoria a largo plazo se vio interrumpida. No obstante, cuando la inyección ocurre después de 120 minutos tras al entrenamiento, no hay efectos sobre la consolidación y la memoria a largo plazo no se ve afectada, tal como se había encontrado en estudios anteriores donde la administración de AP5 luego de 120 minutos después del entrenamiento en tareas de discriminación espacial y olfativa no impidió el establecimiento de la memoria (Roullet, Sargolini, Oliverio y Mele, 2001; Tronel y Sara, 2003).

Por otro lado, el antagonista AP5 no afectó la evocación de la memoria de reconocimiento cuando fue administrado antes de la sesión de prueba. Estos resultados concuerdan con numerosos antecedentes que indican que el bloqueo de los receptores NMDA no interfiere con la evocación de diversas tareas (Bermúdez-Rattoni, 2013; Gutiérrez et al., 1999; Levitan et al., 2016).

Además, la hipótesis de integración de la memoria propone que el estado fisiológico del sujeto es una parte esencial del trazo de memoria, y en ausencia de este, no es posible evocar

correctamente la memoria. Dicho evento podría explicar que los fármacos amnésicos favorecen que las memorias sean dependientes del estado y no así de una interrupción de los procesos plásticos que han sido correlacionados a la consolidación. En el presente estudio, basado en reportes de que dos inhibidores de síntesis de proteínas inyectados en la corteza insular después de la adquisición y antes de la evocación generan memorias dependientes de estado en la tarea de ORM (Osorio-Gómez et al., aún sin publicar), se buscó generar una memoria estado-dependiente con antagonistas glutamatérgicos.

Los resultados muestran que la administración de AP5 después de la adquisición y antes de la prueba no logró generar una memoria dependiente de estado. Este fenómeno puede ser explicado debido a la corta duración de los efectos del AP5 (Mizuno et al., 2001), ya que el tiempo de acción de los ISP, que sí logran generar una memoria dependiente de estado en el ORM (Osorio-Gómez et al., aún sin publicar), es como mínimo, mayor a dos horas (Wanisch y Wotjak, 2008). De manera interesante, al aumentar el efecto temporal mediante la doble administración de AP5 inmediatamente y 60 minutos después de la sesión de muestra, los animales sí fueron capaces de reconocer el objeto novedoso cuando de nueva cuenta se encontraban bajo los efectos del AP5 durante la sesión de prueba. Es importante notar que la inducción de la dependencia de estado fue posible únicamente cuando el tiempo de acción fue ampliado y no cuando el fármaco se administró una sola vez.

Por su parte, el fármaco CNQX no mostró tener efectos sobre la consolidación cuando fue inyectado en una sola ocasión en ninguno de los protocolos, ya fuera a 0 o 60 minutos tras la adquisición, pero sí cuando fue administrado inmediatamente después de la adquisición y 60 minutos después. A pesar de que el proceso de consolidación no es frecuentemente ligado a la acción de los receptores AMPA, existen reportes de que el CNQX impide la consolidación del

ORM (Winters y Bussey, 2005) e evitación pasiva (Izquierdo et al., 2007) cuando es administrado luego del entrenamiento de dichas tareas. Se puede explicar este fenómeno en dos sentidos: Por un lado, si seguimos la hipótesis de consolidación, es posible que la interrupción prolongada de la transmisión excitatoria rápida en la CI no permita que se dé ningún tipo de mecanismo intracelular para soportar la memoria a largo plazo. Mientras que si tomamos como base la hipótesis de integración, es el efecto del fármaco durante este periodo podría pasar a ser parte integral del trazo de memoria, y al no estar dicho estado durante la evocación, no hay una correcta recuperación. Asimismo, el bloqueo de los receptores AMPA mostró impedir la evocación de la memoria de reconocimiento, tal como se había descrito en la tarea de ORM, con la inyección de CNQX antes de la evocación en la corteza perirrinal (Winters y Bussey, 2005; Banks et al., 2014), así como con otras tareas y estructuras, como el caso del hipocampo y la corteza entorrinal en tareas espaciales y de evitación pasiva (Bast, da Silva y Morris, 2005; Izquierdo et al. 1993).

Así, en este trabajo se aporta evidencia de la relevancia de los receptores AMPA en la evocación de la memoria en general. De manera similar al AP5, el fármaco CNQX también logró generar una memoria dependiente de estado cuando se amplió el tiempo de acción. Se demostró entonces que la memoria de reconocimiento se puede hacer dependiente de estado a través del bloqueo de los receptores glutamatérgicos mediante el uso de antagonistas como el CNQX y AP5, únicamente cuando se incrementa el tiempo de acción. Por lo tanto, se aporta evidencia de que el impedimento ocasionado por los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA en la consolidación del ORM puede ser visto como una discrepancia en los estados fisiológicos durante el establecimiento y recuperación de la memoria y no como una interrupción de los procesos plásticos.

De manera interesante, se puede proponer que la inducción de la dependencia de estado está restringida a una ventana temporal menor a los 120 minutos después de la adquisición, en la cual la memoria es susceptible a los agentes amnésicos aquí analizados. Ya que la administración de AP5 a los 120 minutos, es decir, una vez transcurrida la ventana de consolidación, no genera una memoria de reconocimiento estado-dependiente. Este fenómeno también fue observado con otros dos inhibidores de síntesis de proteínas; anisomicina y DRB (Osorio-Gómez et al., aún sin publicar) y por tanto existe evidencia sólida en cuanto a esta ventana temporal.

Debido a la metodología utilizada, no es posible conocer qué estado está siendo generado con los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA. Una vía fructífera es buscar caracterizar los estados inducidos por medio del registro electrofisiológico, o mediante la búsqueda de marcadores moleculares.

En cuanto a la hipótesis aquí planteada sobre la dependencia de estado, es conveniente investigar si existen otras tareas que también se pueden hacer estado-dependientes mediante el uso de distintos fármacos amnésicos.

Además, se requiere conocer si las ventanas temporales son similares entre las diferentes tareas o si, por el contrario, diferentes tipos de memoria tienen periodos críticos de labilidad distintos.

CONCLUSIONES

En este estudio se analizaron los efectos de dos fármacos antagonistas de glutamato en la CI sobre la memoria de reconocimiento y la inducción de memorias estado-dependientes. Aquí se corroboró que el funcionamiento de la CI es crucial para la formación y recuperación de la memoria de reconocimiento.

En este trabajo, la hipótesis de consolidación fue sometida a prueba y se encontró que el bloqueo de los receptores glutamatérgicos durante la consolidación no lleva a una amnesia permanente, si no que esta puede ser revertida cuando se presenta la misma condición durante la evocación. Se observó que la administración del antagonista de receptores NMDA, interrumpe el proceso de consolidación de una tarea de reconocimiento, sin embargo, al ampliar el tiempo de acción del fármaco y al administrarlo antes de la evocación, la memoria se recupera por un fenómeno de dependencia de estado. Por otra parte, se encontró que el antagonista de receptores AMPA interfiere con el proceso de evocación de la memoria de la tarea de ORM, así como con la consolidación cuando su tiempo de acción es ampliado. Este efecto sobre la consolidación es revertido cuando los efectos del CNQX están también presentes durante la evocación de la tarea, generando así la recuperación de la memoria explicada mediante la dependencia de estado.

Es importante notar que la memoria dependiente de estado fue inducida siempre y cuando se realizaran dos inyecciones de los fármacos durante un periodo menor a dos horas después de la adquisición de la tarea y no después. Es decir, existe una ventana de labilidad dentro de la cual el fármaco es capaz de convertirse en un atributo más de la memoria, donde el estado fisiológico generado por los fármacos amnésicos puede integrarse al trazo de memoria reconocimiento y llevar a la dependencia de estado, lo cual nos puede ayudar a repensar la manera en que se estudia la consolidación y recuperación de la memoria desde la neurobiología.

REFERENCIAS

Abel, T. y Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology*, 11(2): 180-187. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00194-X

- Antunes, M. y Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, 13(2): 93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & Memory*, 15(9): 618–624. <http://doi.org/10.1101/lm.1028008z>
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J. y Bermúdez-Rattoni, F. (2014). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285(): 213-222. doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.049
- Banks, P.J., Warburton, E.C., Brown, M.W., Bashir, Z.I. (2014). Mechanisms of Synaptic Plasticity and Recognition Memory in the Perirhinal Cortex. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 122(): 193-209. doi: 10.1016/B978-0-12-420170-5.00007-6
- Bast, T., da Silva, B. M. y Morris, R. G. (2005). Distinct Contributions of Hippocampal NMDA and AMPA Receptors to Encoding and Retrieval of One-Trial Place Memory. *Journal of Neuroscience*, 25(25): 5845-5856. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0698-05.2005
- Bear, M. F., Connors, B. W. y Paradiso, M. A. (2016). *Neuroscience: exploring the brain*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer.
- Ben-Yakov, A., Dudai, Y. y Mayford, M. R. (2015). Memory Retrieval in Mice and Men. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 7(12): 1-28. doi: 10.1101/cshperspect.a021790

Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The Forgotten Insular Cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109(): 207-216. doi: 10.1016/j.nlm.2014.01.001

Bermudez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B. y McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & memory*, 12(5): 447-449. doi: 10.1101/lm.97605

Broadbent, N. J, Squire, L.R. y Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40): 14515-14520. doi: 10.1073/pnas.0406344101

Brown, M. W. y Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(1): 51-61. doi: 10.1038/35049064

Carlson, N. R. (2014). Fisiología de la conducta. Madrid, España: Pearson Education.

Ceretta, A.P.C., Camera, K., Mello, C.F. y Rubin, M.A. (2008). Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology*, 201(3): 405-411. doi: 10.1007/s00213-008-1304-7

Chance, P. (2001). Aprendizaje y conducta. México: Manual Moderno.

Davis, H. P. y Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological bulletin*, 96(3): 518-519. PMID: 6096908

- Dingledine, R. y McBain, C. J. (2008) Glutamate and glutamate receptors. En Brady et al. (Eds), *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. Philadelphia, PA: Elsevier Academic Press.
- Domjan, M. (2010). *Principios de aprendizaje y conducta*. México: Cengage Learning.
- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2): 211-216 PMID: 12015239
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual review of Psychology*, 55(): 51-86. doi: 10.1146/annurev.psych.55.090902.142050
- Dudai, Y. (2006). Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol.*, 16(2):174-178. doi: 10.1016/j.conb.2006.03.010
- Galimberti, U. (2002). *Diccionario de psicología*. México: Siglo veintiuno editores.
- Gallo, M. (2007). Reversible Inactivation of Brain Circuits in Learning and Memory Research. En Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3922/#ch8.s2>
- Gisquet-Verrier, P., Lynch III, J. F., Cutolo, P., Toledano, D., Ulmen, A., Jasnaw, A. M. y Riccio, D. C. (2015). Integration of New Information with Active Memory Accounts for Retrograde Amnesia: A Challenge to the Consolidation/Reconsolidation Hypothesis? *The Journal of Neuroscience*, 35(33): 11623–11633. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1386-15.2015
- Girden, E., & Culler, E. (1937). Conditioned responses in curarized striate muscle in dogs. *Journal of Comparative Psychology*, 23(2): 261-274. doi: 10.1037/h0058634

Gluck, M. A., Mercado, E. y Myers, C. E. (2009). *Aprendizaje y memoria: Del cerebro al comportamiento*. México: McGraw Hill.

Gutiérrez, H., Hernández-Echeagaray, E., Ramírez-Amaya, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, 89(3): 751-758. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00360-1)

Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P., Bermúdez-Rattoni, F. (2010). Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *Journal of Neurochemistry*, 114(1): 226-236. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06758.x

Izquierdo, I., Bianchin, M., Silva, M.B., Zanatta, M.S., Walz, R., Ruschel, A.C., Da Silva, R.C., Paczko, N. y Medina, J.H. (1993). CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. *Behavioral and neural biology*, 59(1):1-4. PMID: 8095135

Izquierdo, I., Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K. and Medina, J. H. (1997), Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. *European Journal of Neuroscience*, 9(): 786–793. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01427.x

Izquierdo, L.A., Barros, D.M., da Costa, J.C., Furini, C., Zinn, C., Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I. (2007). A link between role of two prefrontal areas in immediate

memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(2): 160-166. doi: 10.1016/j.nlm.2007.04.014

Jackson, A., Koek, W. y Colpaert, F.C. (1992). NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. *Behavioural Pharmacology*, 3(4): 415-421. PMID: 11224144

Jafari-Sabet, M., Mofidi, H. y Attarian-Khosroshahi, M.S. (2018). NMDA receptors in the dorsal hippocampal area are involved in tramadol state-dependent memory of passive avoidance learning in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(1): 45-50. doi: 10.1139/cjpp-2017-0228

Kandel, E. R., Dudai, Y., Mayford, M. R. (2014). The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell*, 157(1): 163-186. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.001.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H. y Jessell, T. M. (2001). *Principios de neurociencia*. España: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.

Kesner, R. P. (2013). Neurobiological foundations of an attribute model of memory.

Comparative Cognition & Behavior Reviews, 8(1): 29-59.

Latchman, D., S. (1993). Transcription factors: an overview. *International journal of Experimental Pathology*, 74(5): 417-422. PMCID: PMC2002184

Levitan, D., Gal-Ben-Ari, S., Heise, C., Rosenberg, T., Elkobi, A., Inberg, S., Sala, C. y Rosenblum, K. (2016). The differential role of cortical protein synthesis in taste memory formation and persistence. *npj Science of Learning*, 1(): 1-9. doi:10.1038/npjscilearn.2016.1

- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6): a005710. doi: 10.1101/cshperspect.a005710
- Malenka, R. C. y Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. *Neuron*, 44(1): 5-21. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.012.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., Morris, G. M. (2000). SYNAPTIC PLASTICITY AND MEMORY: An Evaluation of the Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, 23(): 649-711. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.649
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451): 248-51. PMID: 10634773
- McGaugh, J. L. (2007). Searching for Memory in the Brain: Confronting the Collusion of Cells and Systems. En Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3919/#ch1.s3>
- Mizuno, T., Kanazawa, I. and Sakurai, M. (2001), Differential induction of LTP and LTD is not determined solely by instantaneous calcium concentration: an essential involvement of a temporal factor. *European Journal of Neuroscience*, 14(): 701–708. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01679.x
- Moraga-Amaro, R. y Stehberg, J. (2012). The Insular Cortex and the Amygdala: Shared Functions and Interactions. En Ferry, B. (Ed.) *The Amygdala - A Discrete Multitasking Manager*. InTech, doi: 10.5772/51552.

- Nelson, C. A., Thomas, K. M. y de Haan, M. (2007). *Neural Bases of Cognitive Development*. En Damon, W. y Lerner, R. M. (Eds.) *Handbook of Child Psychology (Vol. 2)*. Palo alto, CA: John Wiley and Sons, Inc.
- Niswender, C. M., Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50 (): 295-322. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
- O'Connor, C. M. & Adams, J. U. (2014). *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education.
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K., y Bermúdez-Rattoni, F. (2016). Memory trace reactivation and behavioral response during retrieval are differentially modulated by amygdalar glutamate receptors activity: interaction between amygdala and insular cortex. *Learning & Memory*, 24(): 14–23. doi: 10.1101/lm.042895.116
- Overton, D.A. (1991). Historical context of state dependent learning and discriminative drug effects. *Behavioural Pharmacology*, 2(4): 253-264. PMID: 11224069
- Paxinos G, Watson C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Academic Press.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., Williams, S. M. (2004). *Neuroscience*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Pankevich, D. E., Davis, M. y Altevogt, B. M. (2011). *Glutamate-Related Biomarkers in Drug Development for Disorders of the Nervous System: A Workshop Summary*. Washington, DC: The National Academies Press.

- Parkes, S.L., De la Cruz, V., Bermúdez-Rattoni, F., Coutureau, E. y Ferreira, G. (2014). Differential role of insular cortex muscarinic and NMDA receptors in one-trial appetitive taste learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 116(): 112-116. DOI: 10.1016/j.nlm.2014.09.008
- Radulovic, J., Jovasevic, V. y Meyer, M. AA. (2017). Neurobiological mechanisms of state-dependent learning. *Current opinion in neurobiology*, 45(): 92-98. doi: 10.1016/j.conb.2017.05.013
- Ramírez-Amaya, V. (2007). Molecular Mechanisms of Synaptic Plasticity Underlying Long-Term Memory Formation. En Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3913/#ch3.s1>
- Rezayat, M., Niasari, H., Ahmadi, S., Parsaei, L. y Zarrindast, M. R. (2010). N-methyl-D-aspartate receptors are involved in lithium-induced state-dependent learning in mice. *J. Psychopharmacol.*, 24(6): 915-921. doi: 10.1177/0269881108100093.
- Riedel, G., Platt, B. y Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res.*, 140(1-2):1-47. PMID: 12644276
- Riedel, G. (1996). Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends in Neuroscience*, 19(6): 219-224. doi: 10.1016/0166-2236(96)20012-8
- Ritter, P., Born, J., Brecht, M., Dinse, H. R., Heinemann, U., Pleger, B., ... Kempner, R. (2015). State-dependencies of learning across brain scales. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 9(1): 1-21. doi: 10.3389/fncom.2015.00001

- Roullet, P., Sargolini, F., Oliverio, A. y Mele, A. (2001). NMDA and AMPA Antagonist Infusions into the Ventral Striatum Impair Different Steps of Spatial Information Processing in a Nonassociative Task in Mice. *Journal of Neuroscience*, 21(6): 2143-2149. PMID: 11245698
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.*, 7(2):73-84. doi: 10.1101/lm.7.2.73
- Santoyo-Zedillo, M., Rodriguez-Ortiz, C. J., Chavez-Marchetta, G., Bermudez-Rattoni, F., y Balderas, I. (2014). Retrieval is not necessary to trigger reconsolidation of object recognition memory in the perirhinal cortex. *Learning & Memory*, 21(9): 452–456. doi:10.1101/lm.035428.114
- Shi, C-J & Cassell, Martin. (1998). Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *Journal of Comparative Neurology*, 399(): 440-468. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19981005)399:4<440::AID-CNE2>3.3.CO;2-E.
- Squire, L. R., Wixted, J. T., & Clark, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(11): 872–883. doi:10.1038/nrn2154
- Sternberg, R. J y Sternberg, K. (2012). *Cognitive psychology*. Belmont, CA: Wadsworth, Cengage Learnig.
- Taylor, C.J., Ohline S.M., Moss, T., Ulrich, K. y Abraham, W.C. (2016). The persistence of long-term potentiation in the projection from ventral hippocampus to medial prefrontal cortex in awake rats. *European Journal of Neuroscience*, 43(69): 811-822. doi:10.1111/ejn.13167

- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3): 405–496. doi:10.1124/pr.109.002451
- Tronel, S. y Sara, S. J. (2003). Blockade of NMDA Receptors in Prelimbic Cortex Induces an Enduring Amnesia for Odor–Reward Associative Learning. *Journal of Neuroscience*, 23(13): 5472-5476. PMID: 12843246
- Wanisch, K. y Wotjak, C. T. (2008). Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiology of learning and memory*, 90(3): 485-494. doi: 10.1016/j.nlm.2008.02.007
- Warburton, E. C., Brown, M. W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285(15): 131-139. doi: 10.1016/j.bbr.2014.09.050
- Warburton, E. C., Barker, G. R. I., & Brown, M. W. (2013). Investigations into the involvement of NMDA mechanisms in recognition memory. *Neuropharmacology*, 74(100): 41–47. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.013
- West, A. E., Griffith, E. C., y Greenberg, M. E. (2002). Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(12):921-931. doi: 10.1038/nrn987
- Winters, B. D. y Bussey, T. J. (2005). Glutamate Receptors in Perirhinal Cortex Mediate Encoding, Retrieval, and Consolidation of Object Recognition Memory. *The journal of neuroscience*, 25(17), 4243-4251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0480-05.2005
- Winters, B. D., Saksida, L. M. y Bussey, T. J. (2008) Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(5): 1055-1070. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.04.004

Yan X, Liu J, Ye Z, Huang J, He F, Xiao W, et al. (2016) CaMKII-Mediated CREB Phosphorylation Is Involved in Ca²⁺-Induced BDNF mRNA Transcription and Neurite Outgrowth Promoted by Electrical Stimulation. *PLoS ONE*, 11(9): 1-22. doi:10.1371/journal.pone.0162784

Yiannakas, A., & Rosenblum, K. (2017). The Insula and Taste Learning. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(335). doi:10.3389/fnmol.2017.00335

Zarrindast, M.R., Jafari-Sabet, M., Rezayat, M., Djahanguiri, B. y Rezayof, A. (2006). INVOLVEMENT OF NMDA RECEPTORS IN MORPHINE STATE-DEPENDENT LEARNING IN MICE. *International journal of neuroscience*, 116 (6): 731-743. doi: 10.1080/00207450600675068