



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTO DEL SOBRRERFORZAMIENTO EN LA TAREA DE EVITACIÓN INHIBITORIA
SOBRE LOS NIVELES DE PROTEÍNA CINASA C FOSFORILADA EN CÉLULAS
ESTRIATALES DE RATA**

TESIS

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

PRESENTA

LUIS ALBERTO VERDÍN RUVALCABA

TUTOR

DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA,
UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA ISABEL MIRANDA SAUCEDO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DRA. LIVIA SÁNCHEZ CARRASCO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

QUERÉTARO, QUERÉTARO, 9 DE MAYO DEL 2023



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

Hago uso de este espacio para expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas y unidades institucionales que, de manera directa o indirecta, colaboraron en la realización de este proyecto de investigación. Agradezco, en primer lugar, a la **Universidad Nacional Autónoma de México** y al **Instituto de Neurobiología** *por acogerme en sus recintos y por ser el espacio permisivo de mis actividades académicas.*

En particular agradezco el tiempo, empeño y apoyo brindado por el **Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá**, jefe del laboratorio en donde se realizaron los experimentos reportados en esta tesis y director de la misma. Sin su compromiso, ideas y dedicadas observaciones, este trabajo no habría podido siquiera dar sus primeros pasos. Como forma de agradecimiento, manifiesto mi gran admiración por los logros que ha alcanzado en el campo de la neurobiología de la memoria, por su inagotable pasión por el tema de los mecanismos neuronales del sobrerreforzamiento y por saber mantener vivo ese interés entre sus estudiantes. *Gracias Dr. Prado por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo tu dirección y haberme formado durante estos años.*

También agradezco, encarecidamente, a dos pilares importantísimos en nuestro equipo de trabajo: a la **Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso** y a la **Dra. Paola Cristina Bello Medina**. Gracias por su paciencia, su escucha atenta, sus comentarios y bondadosos consejos (y regaños) que acompañaron este proceso. *Toda mi experiencia práctica de laboratorio, se las debo a ustedes: gracias por tanta sabiduría y sensatez.*

A los miembros del laboratorio les agradezco de manera especial. A la **Dra. Gina Lorena Quirarte** y a la **M.V.Z. Norma Serafín López** por la organización y control administrativo del laboratorio. Al **Sr. Bernardino Osorio Rojas** y a la **Sra. Bertha Islas** por el manejo y cuidado de los animales de experimentación y por el mantenimiento adecuado de las instalaciones. A todos los compañeros de laboratorio, por compartir de sus conocimientos y experiencias, por favorecer las discusiones teóricas en los seminarios y por su apertura al diálogo. Hago un agradecimiento particular a mis queridos compañeros **Rafa**, **Martha** y **Alhelí**, con quienes compartí acaloradas discusiones académicas, de intereses personales y de la vida cotidiana, ya sea en el laboratorio o fuera de él. *Gracias por su acompañamiento.*

Gracias a los miembros del Comité tutor, a la **Dra. Livia Sánchez Carrasco** y a la **Dra. María Isabel Miranda Saucedo**, que con sus aportaciones críticas marcaron una línea rectora del trabajo y ayudaron a la maduración de este. De gran relevancia resultaron los comentarios,

cuestionamientos y observaciones recibidas de su parte a lo largo de los 4 semestres del posgrado. Agradezco, además, su diligencia y disposición para que las formalidades del mismo se cumplieran en tiempo y de manera adecuada.

A las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología y a sus encargados: a la **Unidad de Microscopía**, en especial a la **Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos** por toda su apoyo y guía durante la obtención de imágenes; a la **Unidad de Videoconferencia**, especialmente a la **Mtra. María de Lourdes Lara Ayala**, que siempre recordaré con su amable disposición a ayudar; a todo el personal del **Bioterio** y al de la **Biblioteca del campus Juriquilla**. A la **Unidad de Enseñanza y Posgrado**, particularmente a la **Dra. Nuri Aranda**, por la información y apoyo brindado. A todos ellos, gracias.

A los miembros del jurado de examen: **Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda**, **Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá**, **Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez**, **Dra. Livia Sánchez Carrasco** y **Dra. Wendy Portillo Martínez**. Gracias por aceptar formar parte de este trabajo evaluándolo y aportando pertinentes observaciones y sugerencias con miras a su enriquecimiento.

A todos mis **profesores** y **compañeros** que acompañaron este proceso y de quienes aprendí algunas de las virtudes necesarias para el quehacer científico: constancia, esfuerzo, pensamiento crítico, tolerancia a la frustración y, sobre todo, pasión.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por el financiamiento otorgado durante mi formación, con la beca de maestría N°: 928161.

Por último, quiero hacer un especial agradecimiento a **mis padres**, por su comprensión y apoyo en esta trayectoria; a mis hermanos, por su disposición a la ayuda aún a la distancia; a mis queridos amigos, **Cynthia Maldonado**, **Juan Pablo Márquez**, **Ameyaltzin Castillo** y **Aron Kelley** por los buenos momentos que pasamos dentro y fuera de las instalaciones del INB; a **Ana Lilia Reyna Viera**, mi ranita hermosa, por decidir acompañarme en la vida. Mil gracias a cada uno de ustedes, por su aprecio y cariño.

“Gracias a la vida que me ha dado tanto...”

Abreviaturas

5-HT: Serotonina

Ach: Acetilcolina

aPKC: PKC atípicas

ATP: Adenosín trifosfato

cPKC: PKC convencionales

DAG: Diacilglicerol

ECS: Choques electroconvulsivos

EDC: Estriado dorsocentral

EDL: Estriado dorsolateral

EDM: Estriado dorsomedial

EI: Evitación inhibitoria

EVC: Estriado ventrocentral

EVL: Estriado ventrolateral

EVM: Estriado ventromedial

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

GB: Ganglios basales

GPe: Globo pálido externo

G-perm: GAP-43 permanentemente pseudofosforilada

GPI: Globo pálido interno

IP₃: Insositol trifosfato

IT: Neuronas intratalámicas

MCP: Memoria de corto plazo

MLP: Memoria de largo plazo

MSNs: Neuronas espinosas medianas

nPKC: PKC novedosas

PI₂: Fosfatidilinositol bifosfato

PKA: Proteínas cinasas dependientes de cAMP

PKC: Proteínas cinasas C

PKG: Proteínas cinasas dependientes de cGMP

PLC: Fosfolipasa C

pPKC: Proteína cinasa C fosforilada

PS: Fosfatidilserina

PSIs: Inhibidores de síntesis de proteínas

SNc: Substancia nigra pars compacta

SNr: Substancia nigra pars reticulata

STN: Núcleo subtalámico

TP: Neuronas del tracto piramidal

TSA: Amplificación de señales de tiramida

VTA: Área tegmental ventral

INDICE

Agradecimientos	II
Abreviaturas.....	IV
Abstract.....	1
Resumen	2
I. Introducción	3
II. ANTECEDENTES	4
1. Memoria	4
1.1. Consolidación	7
1.1.1. Síntesis de proteínas	12
1.2. Aprendizaje incrementado	14
2. Estriado	20
2.1. Organización: proyecciones y tipos celulares	20
2.2. Neuromodulación.....	23
2.3. Estriado y procesos de aprendizaje y memoria	25
3. Proteína Cinasa C.....	28
3.1. Estructura y activación.....	29
3.2. Relación con procesos de aprendizaje y memoria	31
III. JUSTIFICACIÓN.....	34
IV. OBJETIVOS.....	35
V. HIPÓTESIS.....	36
VI. METODOLOGÍA.....	36
1. Sujetos	36
2. Aparatos	36
3. Entrenamiento y prueba de retención	37
4. Análisis histológico	38
4.1. Extracción de cerebros y criosección	38
4.2. Inmunohistoquímica.....	38
4.3. Captura y análisis de imágenes.....	39
5. Análisis estadístico	40
6. Diseño experimental.....	40
VII. RESULTADOS.....	41
1. Conducta.....	41
2. Inmunohistoquímica	43

2.1. Niveles de la pPKC en el estriado completo	45
2.2. Niveles de la pPKC en la región dorsal del estriado	46
2.3. Niveles de la pPKC en la región ventral del estriado	48
2.4. Niveles de la pPKC en regiones particulares del estriado	49
2.5. Comparaciones intragrupalas de los niveles de la pPKC en regiones particulares del estriado.....	51
VIII. DISCUSIÓN	53
IX. CONCLUSIONES.....	57
X. REFERENCIAS	58

Abstract

Neuronal protein synthesis is a process that classically has been involved in the consolidation of memories; nevertheless, a growing body of evidence indicates that this process is unnecessary in situations of over-reinforcement, a phenomenon where learning is mediated by high aversive stimulation. Studies regarding the physiological mechanisms that allow the formation of memory under such conditions are yet inconclusive. What is known is that there is an induction of mushroom spinyogenesis in neurons of dorsomedial striatum related to over-reinforcement in the inhibitory avoidance task. We propose that these morphofunctional changes are dependent upon the broad signaling cascades triggered by different kinases. In particular, we are interested in the role of phosphorylated protein kinase C (pPKC) since its activation has been associated to learning and memory processes. To determine whether over-reinforcement modifies levels of pPKC in different regions of striatum, groups of Wistar rats were trained in the one-trial step-through inhibitory avoidance task using different levels of foot-shock intensity (0.0, 1.0, and 3.0 mA). Rats from each condition were sacrificed 60 min after training for immunohistochemical pPKC detection in dorsal and ventral striatum. The results indicate that independently of the strength of the training the levels of pPKC are similar in all groups. We neither found statistically significant differences regarding cerebral lateralization or striatal regions. The lack of evidence supporting the role of PKC in the striatum for a task aversively motivated leads us to conclude that the morphofunctional changes observed in the dorsomedial portion of the striatum are not due to an alteration in the levels of pPKC at 60 min after training.

Resumen

La síntesis de proteínas neuronales es un proceso que de manera clásica se ha visto involucrada en la consolidación de la memoria; sin embargo, evidencia creciente indica que este proceso es innecesario en situaciones de sobrerreforzamiento, un fenómeno en el que el aprendizaje está mediado por una estimulación aversiva intensa. Los estudios concernientes a los mecanismos fisiológicos que permiten la formación de la memoria bajo esas condiciones resultan todavía discutibles. Se ha reportado que en la tarea de evitación inhibitoria, hay una inducción de espinogénesis tipo hongo en neuronas del estriado dorsomedial relacionada con el sobrerreforzamiento. Es posible que estos cambios morfofuncionales sean dependientes de la amplia cascada de señalización producidas por diferentes cinasas. En particular, estamos interesados en la función de la proteína cinasa C fosforilada (pPKC) ya que su activación se ha asociado a procesos de aprendizaje y memoria. Para determinar si el sobrerreforzamiento modifica los niveles de la pPKC en diferentes regiones del estriado, se entrenó a grupos de ratas Wistar en la tarea de evitación inhibitoria (step-through) usando diferentes niveles de intensidad de choque (0.0, 1.0 y 3.0 mA). Las ratas de cada condición fueron llevadas a punto final humanitario 60 min después del entrenamiento para la detección inmunohistoquímica de pPKC en el estriado dorsal y ventral. Los resultados indican que, independientemente del tratamiento, los niveles de la pPKC son similares en todos los grupos. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con la lateralización hemisférica o en diferentes regiones del estriado. La falta de evidencia que apoye el rol de la PKC en el estriado para una tarea motivada de manera aversiva, lleva a la conclusión de que los cambios morfofuncionales observados en la porción dorsomedial del estriado no son debidos a una alteración en los niveles de la pPKC a los 60 min después del entrenamiento.

I. Introducción

El sobrerreforzamiento es un tipo de aprendizaje mediado por una estimulación aversiva intensa que produce una alta resistencia a la extinción y provoca un efecto protector en contra de tratamientos amnésicos (Prado-Alcalá et al., 1995, 2007). Hasta el momento, se desconocen los mecanismos que permiten la consolidación de la memoria bajo estas condiciones; si bien, la síntesis de proteínas *de novo* es un mecanismo que ha sido ampliamente explorado y relacionado con el almacenamiento de información, no es suficiente para explicar la formación de la memoria en situaciones de sobrerreforzamiento. Hay evidencia que indica que la administración sistémica o intracraneal de inhibidores de los procesos de transcripción y traducción celular, como DRB y anisomicina, es inocua para la consolidación en sujetos que recibieron un entrenamiento con estimulación intensa en la tarea de evitación inhibitoria (EI), en contraste con la amnesia producida en sujetos con entrenamiento leve o moderado (Medina et al., 2019). Acorde con esta idea, se hipotetiza que en los sujetos con el entrenamiento intenso se activan mecanismos independientes a la síntesis de proteínas para que se establezca el trazo de memoria. Como fenómeno explicativo, se han propuesto a los mecanismos post-traduccionales por su papel en las cascadas de señalización intracelular que ayudan a mantener cambios morfológicos y funcionales en las células nerviosas (Routtenberg & Rekart, 2005; Holahan & Routtenberg, 2008). De manera particular, en este trabajo se enfatiza la fosforilación de las proteínas cinasas C (PKC) y su relación con procesos de plasticidad sináptica.

Como miembro del grupo de proteínas AGC, la PKC constituye una familia de cinasas altamente conservada en la escala filogenética cuyas funciones se han relacionado con procesos que permiten una mayor eficiencia sináptica, tales como vesiculación y liberación de neurotransmisores, reclutamiento de subunidades AMPA para la conformación de receptores en la membrana plasmática y generación de espinas dendríticas. Además, en diversas especies y utilizando una gran variedad de paradigmas conductuales se ha visto la participación de las PKC en procesos de aprendizaje y memoria. A pesar de su amplio estudio, es poco lo que se conoce respecto a cómo contribuye en la consolidación de la memoria en el estriado, una región de interés para entender los procesos de asociación en aprendizajes estímulo-respuesta. La parcelación de esta estructura en sus porciones dorsal-ventral y medial-lateral ha dado luz sobre las funciones particulares que éstas adquieren ante distintos tratamientos, por lo que en este trabajo se pretende utilizar esta división, para profundizar en

la función de la PKC. Se discutirá el cambio en los niveles de PKC fosforilada en la S660 tras la exposición a experiencias de aprendizaje moderado e incrementado, pretendiendo con ello generar una visión más amplia de la dinámica molecular implicada en el sobrerreforzamiento.

II. ANTECEDENTES

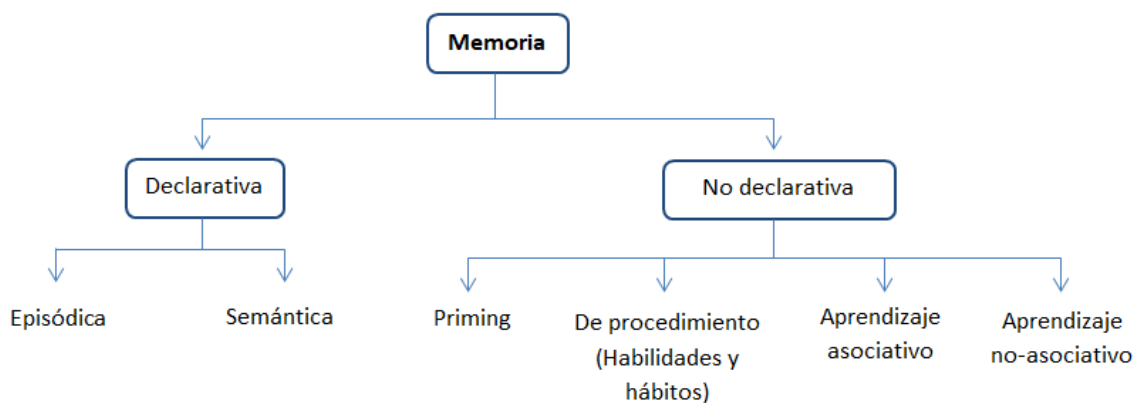
1. Memoria

La memoria es un proceso cognitivo esencial para el funcionamiento integral de los organismos y su supervivencia. Se presenta como consecuencia de una experiencia de aprendizaje que permite el almacenamiento y recuperación de información. Sus procesos pueden ser inferidos a través de cambios en patrones de conducta asociados a la experiencia de aprendizaje. Existen diversas formas en las que se clasifica la memoria; las más comunes son las que consideran la naturaleza de la información almacenada y las que contemplan el tiempo en el que esa información está disponible para su recuperación (Schacter & Wagner, 2013). Las clasificaciones están dadas en gran medida por la caracterización neuropsicológica del paciente Henry Molaison (mejor conocido como H.M.), quien, tras ser sometido a un procedimiento de resección quirúrgica de estructuras del lóbulo temporal medial como tratamiento de crisis convulsivas severas, presentaba déficits para retener información más allá de unos cuantos minutos, en ausencia aparente de otro daño cognitivo (Milner, Squire & Kandel, 1998). Este deterioro generalizado, persistente y severo de la memoria también se encontró en otros pacientes con remoción bilateral de estructuras del lóbulo temporal que incluían al hipocampo (Penfield & Milner, 1958).

Una característica sobresaliente que se observó en el paciente H.M. fue su capacidad para aprender ciertos tipos de tareas de manera comparable a la de sujetos control. Se mostró que, en el dominio de habilidades motoras, evaluado con la tarea de dibujo en espejo, el paciente presentaba mejoría en los niveles de retención a lo largo de las sesiones de prueba, mostrando una curva de aprendizaje normal aun cuando no recordaba que con anterioridad había realizado la prueba (Milner, 1962). Por otro lado, se utilizó la tarea de figuras de Gollin, que consiste en la presentación de figuras incompletas que tienen que ser descifradas por el observador, para medir el efecto de la experiencia visual primaria (priming) sobre la capacidad de retención perceptual. Se observó que, de la misma manera que en sujetos sin ninguna condición clínica, H.M. requería de un menor número de claves en las presentaciones

subsecuentes para nombrar el objeto, por lo que se concluye que el aprendizaje perceptual se encontraba conservado (Milner, Corkin & Teuber, 1968). Esto contribuye a la idea de que existen sistemas de memoria múltiples que se encuentran en circuitos neuronales específicos. De ahí nace la necesidad de clasificar a la memoria bajo consideración de la naturaleza de la información.

En esta clasificación se divide a la memoria en declarativa y no-declarativa. La memoria declarativa se refiere al almacenamiento de experiencias que pueden ser evocadas de manera consciente e incluye el conocimiento de las experiencias vividas por el individuo (memoria episódica) y el conocimiento de información general acerca del mundo, que no ha sido adquirido a través de la experiencia directa del individuo, tal como los datos históricos, geográficos, etc. (memoria semántica). Por otro lado, la memoria no-declarativa se manifiesta de manera automática con poco procesamiento consciente de parte del sujeto, tales como los aprendizajes que implican habilidades motoras (Squire, 2004). En este tipo de memoria se incluye el *priming*, los hábitos y los aprendizajes asociativos (condicionamiento clásico e instrumental) y no-asociativos (habituaación, sensibilización). Gran parte de los avances en el entendimiento del almacenamiento de información a nivel molecular y de sistemas está basado en este tipo de memorias dada su relativa sencillez de estudio en modelos animales (véase Esquema 1).



Esquema 1. Taxonomía de los sistemas de memoria (modificado de Squire, 2004).

En la clasificación en función del tiempo se considera a la memoria de corto plazo (MCP) y la memoria de largo plazo (MLP). H.M. presentaba dificultades para generar nuevos recuerdos después de la cirugía; las impresiones inmediatas de su contexto se perdían tan pronto como su atención cambiaba, no reconocía a los miembros del hospital y mostraba desorientación espacial, sin embargo, era capaz de recordar eventos, personas y lugares de su infancia (Milner et al., 1998). Este y otros casos similares sugirieron que existían procesos de memoria primarios caracterizados por un decaimiento rápido de la información (memoria de corto plazo), y procesos secundarios de duración prolongada (memoria de largo plazo), dañados en H.M. (Milner, 1972). Se considera que la disponibilidad de información en el almacén de MCP va de minutos a horas, en contraposición con la capacidad de la MLP, que es de días, semanas o, incluso, vitalicia (Bailey, Bartsch & Kandel, 1996). Hay evidencia que sugiere que la memoria no es un proceso continuo en el que el almacén de corto plazo antecede y funciona como base del de largo plazo, sino que cada uno de éstos actúa en paralelo y es regulado por mecanismos particulares (Izquierdo, Medina, Vianna, Izquierdo & Barros, 1999). Más adelante se discutirán los mecanismos moleculares descritos para cada uno de estos tipos de memoria.

Con independencia del tipo de memoria a considerar, llámese declarativa o no-declarativa, la MLP comprende los procesos de adquisición, consolidación y evocación (véase Figura 1) (Abel & Lattal, 2001; Bailey et al., 1996). La adquisición implica la codificación del conjunto de estímulos que conforman la experiencia novedosa y que puede ser ligada a información previamente almacenada (John, 1977; Schacter & Wagner, 2013); esta puede ocurrir, por ejemplo, en un paradigma de condicionamiento en donde el animal establece una asociación entre un contexto y un choque, para lo cual el organismo debe discriminar las características específicas del ambiente en el que se presentó la estimulación aversiva. Durante la consolidación se estabiliza la información adquirida permitiendo, de esta manera, que se forme la memoria de largo plazo; durante este período la información es susceptible a diversos tipos de interferencias (Prado-Alcalá, Medina, López & Quirarte, 2012). La evocación, también llamada recuperación, sucede cuando la información almacenada se hace manifiesta en forma de recuerdos o patrones de conducta; este proceso es más efectivo si se presenta una “clave” relacionada con la experiencia que dio lugar a la codificación (Schacter & Wagner, 2013). La separación experimental de estas tres fases es posible por la utilización de tratamientos reversibles con efectos de corta duración, siendo en especial útiles si se combinan

con tareas de un solo ensayo (Abel & Lattal, 2001; Igaz, Bekinschtein, Vianna, Izquierdo & Medina, 2004).

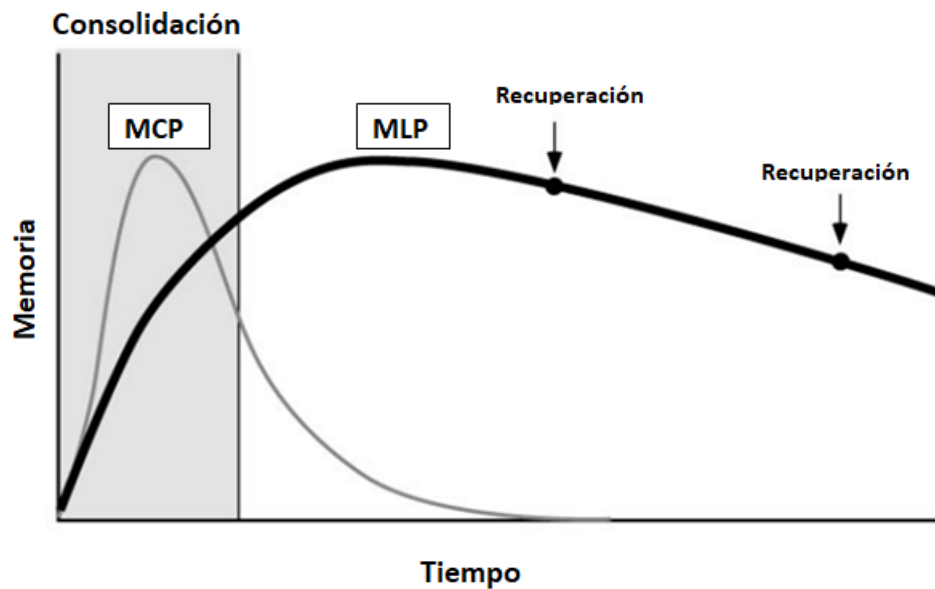


Figura 1. Disponibilidad de la información en los almacenes de la memoria de corto y largo plazo en función del tiempo (modificado de Dudai, 2004).

Los antecedentes mencionados pretenden servir de marco general para situar a la memoria como una entidad compleja, integrada por múltiples sistemas y susceptible a ser estudiada por métodos experimentales. La mayor parte del fundamento teórico de este trabajo está basado en estudios con modelos animales en los cuales se utilizan paradigmas conductuales que implican aprendizajes asociativos (memoria no-declarativa). Además, se hace énfasis en el proceso de consolidación de la MLP, el cual se describirá con mayor detalle en los siguientes apartados.

1.1. Consolidación

A través de relatos anecdóticos, reportes clínicos y evidencia experimental, se ha descrito que la alteración de la actividad neuronal genera déficits en la retención de experiencias cercanas a la interferencia, sin verse afectadas memorias remotas (McGaugh, 2000). La pérdida de información previa al evento interferente, común en traumatismos craneoencefálicos, se entiende como un fenómeno de amnesia retrógrada. En 1881, el psicólogo francés Théodule A. Ribot postuló en su libro *The Diseases of Memory* que el daño

cerebral afecta a las memorias en orden inverso a su formación, de tal manera que las memorias recientemente formadas se pierden en mayor medida que aquellas más antiguas. Es decir, la destrucción de la memoria sigue una lógica en la que se avanza de manera progresiva de lo *inestable* a lo *estable*; esto se conoce como *Ley de Ribot*. Aunque estrictamente esto no es una ley (Squire & Alvarez, 1995), tiene una importante implicación teórica que está bajo la premisa de que se requiere del paso del tiempo para que se establezca la memoria. Müller y Pilzecker (1900), tras una serie de estudios de memoria en humanos, utilizaron el término “consolidación” para referirse a esa ventana temporal en la que la información adquirida por una experiencia de aprendizaje es lábil y, por lo tanto, susceptible a interferencias (Prado-Alcalá, Salado-Castillo, Quiroz, Garín-Aguilar, Díaz-Trujillo, Rivas-Arancibia & Quirarte, 2007).

La evidencia demuestra que durante el período post-adquisición la información puede deteriorarse, es decir, perderse o generar una huella mnémica débil, o bien, generar una memoria robusta, dependiendo del tratamiento que se les dé a los sujetos (McGaugh, 1966; 1973). En modelos animales, se puede demostrar la consolidación generando un efecto amnésico de una experiencia de aprendizaje específica. De forma paralela a la amnesia se debe probar que dicho efecto no se debe a alteraciones sensoriomotoras requeridas para la ejecución de la tarea, a la interferencia con la adquisición o a un efecto de dependencia de estado (Dudai, 2004). De manera clásica, la consolidación se ha mostrado con la utilización de fármacos y con la aplicación de choques electroconvulsivos (ECS, por sus siglas en inglés) tras un entrenamiento (Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 1966; Prado-Alcalá et al., 2012).

En 1949, Duncan reportó un estudio en ratas albinas en el que se probó la hipótesis que establecía que descargas electroconvulsivas imposibilitaban la retención de la memoria, fenómeno observado en pacientes psiquiátricos tratados con terapia de electrochoques. En su trabajo hipotetizó que la depresión en los procesos mnémicos sería mayor (entendida como un decremento en la ejecución) entre más corto fuera el intervalo de terminación del ensayo y la aplicación del ECS. Para probarlo, utilizó una tarea de evitación de múltiples ensayos en la que las ratas eran entrenadas para escapar de un compartimento con rejillas electrificadas a uno seguro en un tiempo menor a 10 s; la medida de retención se consideró a través del número de respuestas anticipatorias dadas. Los resultados indicaron que cuando el intervalo ensayo-ECS es menor a un minuto hay una perturbación sostenida en la retención, esto es, el número de respuestas anticipatorias se mantuvieron bajas a lo largo de las sesiones de entrenamiento. Este efecto de deterioro también fue significativo en el grupo con intervalo de

15 min respecto al grupo control pero no se encontró en los grupos con mayores intervalos, lo que apoya la idea de que el deterioro decrece entre mayor sea el tiempo de aprendizaje y el disturbio a nivel cerebral (Duncan, 1949). Los resultados se explican bajo el marco de la teoría de la consolidación.

Estudios posteriores demostraron que el efecto amnésico inducido por los ECS puede ser bloqueado por diferentes tratamientos, como antagonistas opioides (McGaugh, 1989) o el convulsivante estriquina (Duncan & Hunt, 1972), lo que dio pie a la búsqueda de los mecanismos involucrados en el almacenamiento de información. De esta manera, la importancia del trabajo de Duncan radica en que permitió vislumbrar el acercamiento al fenómeno de consolidación desde una perspectiva experimental. Aunque cabe aclarar que la metodología que utilizó quedó en desuso, en parte porque resultaba difícil determinar si los animales no emitían la respuesta por un efecto amnésico, o si se debía a la asociación del contexto con la descarga eléctrica. Otra razón importante es que la ventana efectiva de tiempo en la que el ECS puede causar amnesia es muy corta en comparación con la de los fármacos (McGaugh, 1966). Es por ello que se han utilizado estrategias farmacológicas para el aislamiento y análisis de la consolidación de la memoria, siendo parte de sus ventajas tener una ventana de acción determinada que permite actuar en el proceso específico de interés, siempre y cuando sus efectos sean reversibles (Abel & Lattal, 2001).

En referencia a los mecanismos que inducen la amnesia retrógrada tras la aplicación de ECS, Kurtz y Palfai (1977) sugieren que la variable causal es la alteración en los niveles de los sistemas de neurotransmisión en el período de almacenamiento. Los autores descartan la posibilidad de que la convulsión *per se* genera el efecto amnésico basándose en la evidencia de que no todos los convulsivantes tienen propiedades amnésicas y porque la amnesia puede verse aún sin la presencia de convulsiones; por semejantes razones eliminan la hipótesis del requerimiento de la fase de depresión postictal para deteriorar el almacenamiento y de las modificaciones en los patrones de actividad neuronal. La propuesta de la depleción de la síntesis de proteínas se rechaza por la evidencia de que los choques electroconvulsivos inhiben el proceso de traducción en un 20%, altamente contrastante con el grado de inhibición producida por los inhibidores de síntesis de proteínas, que es mayor al 80-90% (McGaugh, Zornetzer, Gold & Landfield, 1972). Por otro lado, en la revisión se argumenta que los agentes amnésicos tienen en común la alteración en los niveles de diferentes sistemas de neurotransmisión, como el aumento de acetilcolina (ACh), serotonina (5-HT) y la disminución

de catecolaminas, muy acorde con una visión más reciente de los sistemas neuromodulatorios del almacenamiento de la memoria (McGaugh & Cahill, 1997; McGaugh, 2015).

Durante el período de consolidación la información adquirida es susceptible a interferencias, pudiéndose generar dos efectos en la fuerza de la memoria tras intervenciones de distinta índole: facilitación o deterioro (véase Figura 2). Estas son las medidas estándares con las que se evalúa la efectividad de tratamientos como moduladores del proceso de consolidación. En la metodología común de estos estudios se busca que los tratamientos sean aplicados después del entrenamiento para evitar el problema de su influencia sobre el proceso de adquisición (McGaugh, 1989) y que, además de probar que sean dependientes de tiempo, que sus efectos sean dosis-dependientes. Así, se ha relacionado la participación de hormonas del estrés (glucocorticoides, epinefrina), opioides peptidérgicos y de neurotransmisores noradrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos y GABAérgicos en la modulación de la memoria a nivel de sistemas neuronales (Chávez, Salado-Castillo, Sánchez-Alavez, Quirarte & Prado-Alcalá, 1995; McGaugh, 1973; 1989; 2000; 2015; McGaugh & Cahill, 1997; Roldán, Bolaños-Badillo, González-Sánchez, Quirarte & Prado-Alcalá, 1997; Solana-Figueroa, Salado-Castillo, Galindo, Quirarte & Prado-Alcalá, 2002). Está bien descrito, por ejemplo, que tanto los glucocorticoides (corticosterona/cortisol) como la epinefrina (adrenalina) y la norepinefrina (noradrenalina) se liberan tras entrenamientos en tareas motivadas aversivamente (Ferry & McGaugh, 2000; González-Franco, Ramírez-Amaya, Joseph-Bravo, Prado-Alcalá & Quirarte, 2017) y que estas hormonas adrenales, además, mejoran la consolidación de la memoria a través de la activación de núcleos noradrenérgicos que afectan a distintas regiones cerebrales, como la amígdala y el hipocampo (McGaugh & Roozendaal, 2002). De la misma manera, los sistemas de opioides peptidérgicos se han relacionado con la activación de neuronas noradrenérgicas (Quirarte, Galvez, Roozendaal & McGaugh, 1998), cuya participación se considera crítica para la mediación de eventos con un alto contenido emocional y su almacenamiento, en especial en la amígdala basolateral (Gálvez, Mesches & McGaugh, 1996; McGaugh & Roozendaal, 2002).

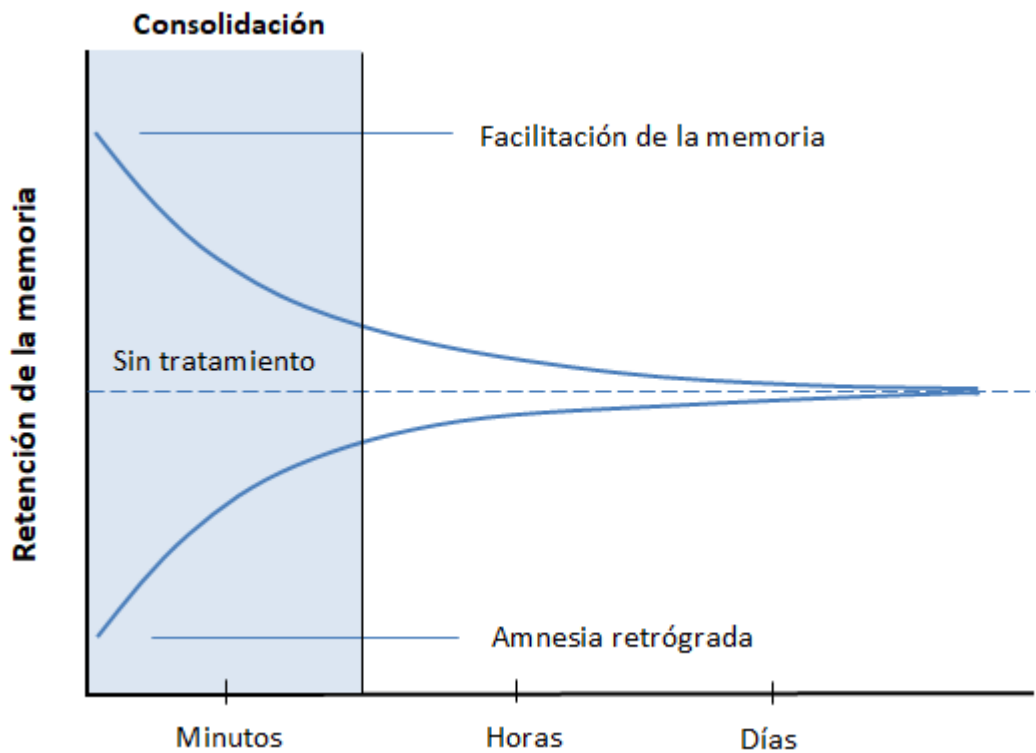


Figura 2. Fortaleza de la memoria en función de tratamientos administrados a diferentes intervalos (modificado de McGaugh, 2003).

De forma simultánea a las investigaciones a nivel de sistemas neuronales, se ha obtenido suficiente evidencia experimental para describir algunos de los mecanismos fundamentales en el almacenamiento de la información a nivel celular y molecular, gracias a la adherencia de aproximaciones reduccionistas que favorecieron el uso de modelos animales más simples (en términos de la cantidad de células nerviosas y sus conexiones) que los mamíferos, como el molusco marino *Aplysia californica* o la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Milner et al., 1998). El argumento base de este enfoque es que las formas elementales del aprendizaje son comunes en todos los animales que han desarrollado un sistema nervioso, de donde se concluye que debe haber mecanismos conservados a distintos niveles que pueden ser estudiados efectivamente en animales tan simples como los invertebrados (Kandel, 2001). De esta postura ha derivado uno de los postulados rectores en el campo de la memoria: la MLP requiere de la síntesis de proteínas *de novo*.

1.1.1. Síntesis de proteínas

En 1950, Katz y Halstead propusieron que la formación de la memoria a nivel molecular podría deberse a la síntesis de proteínas. La hipótesis se puso a prueba con el advenimiento de los inhibidores de síntesis de proteínas (PSIs, por sus siglas en inglés), que también han funcionado como pivote para el entendimiento de la dinámica temporal de la consolidación. Los estudios con PSIs dieron sustento a los argumentos que mantenían que la síntesis de proteínas *de novo* es pre-requisito de las modificaciones sinápticas necesarias para el almacenamiento de información de largo plazo (Hernandez & Abel, 2008). Los trabajos con PSIs mostraron que si se entrena a los sujetos y poco tiempo después se administra el inhibidor, en la prueba de retención se observará un detrimento de la memoria que es explicado por el bloqueo de la síntesis de proteínas (Agranoff, 1965; Barondes & Cohen, 1966; Davis & Squire, 1984; Flexner, Flexner, & Stellar, 1963; Flexner, Flexner, Stellar, de la Haba, & Roberts, 1962). Esto se ha probado en situaciones de aprendizaje en donde la respuesta, o el conjunto de respuestas, se evalúan apenas se alcanza una asíntota, o en donde la estimulación incondicionada es lo suficientemente robusta para generar una respuesta en los sujetos.

Agranoff y col. (1965), en una tarea de evitación en peces dorados, presentaron una de las primeras evidencias del papel de la síntesis de proteínas para el almacenamiento de la información de largo plazo. En su trabajo, se apareó una luz con la descarga de un choque eléctrico; para evitar la estimulación aversiva el pez tenía que cruzar hacia el lado opuesto de la pecera. A un grupo se le administró puromicina (un inhibidor de síntesis de proteínas) intracranealmente después del entrenamiento y se le comparó con otro al que se le inyectó solución salina. Se cuantificó el número de respuestas de evitación a lo largo de 20 ensayos. Durante el entrenamiento se observó que los sujetos tenían de forma paulatina un mayor número de respuestas de evitación. Los autores reportaron que la administración del inhibidor justo después del entrenamiento genera un efecto amnésico, esto es, en la prueba de retención se observa una curva de aprendizaje similar a la obtenida durante los ensayos de entrenamiento, mientras que los sujetos tratados con solución salina tuvieron un número de errores bajos a lo largo de los ensayos de la prueba. Además, se administraron los tratamientos en diferentes ventanas de tiempo. Se reportó que a los 30 minutos la puromicina genera un menor efecto amnésico en comparación a cuando es administrada de forma inmediata. Más aún, si ésta se administra a la hora no genera un detrimento en la memoria; resultados consistentes con lo observado en los estudios de sistemas de neurotransmisión.

Recientemente, con el uso de PSIs e inhibidores transcripcionales se ha obtenido evidencia que sugiere que la consolidación se presenta en dos marcos temporales. El trabajo de Igaz y colaboradores (2002) muestra que este proceso es susceptible a tratamientos amnésicos en dos fases, una en un tiempo cercano al entrenamiento y otra en un período de 3-6 h después del mismo. Se administraron en el hipocampo diferentes tratamientos en varios lapsos de tiempo tras el entrenamiento de los animales en la tarea de evitación inhibitoria (step-down) y se observó que tanto los inhibidores transcripcionales amanitina y DRB como el inhibidor de síntesis de proteínas anisomicina impiden la formación de la memoria de largo plazo cuando son administrados 15 minutos previos al entrenamiento o inmediatamente después del mismo; también se observó el efecto amnésico cuando los tratamientos se aplicaron a las 3, 4.5 y 6 horas concluido el entrenamiento. Por otro lado, resultan inocuos cuando son administrados a la hora o a las 2 horas, lo mismo que a las 7.5 o 9 horas después de la tarea. Estos resultados, además de reforzar la conclusión de que la consolidación es un proceso dependiente de tiempo, abonan a la idea de que la formación de la memoria está en función de la expresión génica.

Esta noción de la síntesis de proteínas como pre-requisito para la formación de la MLP se ha asociado a la propuesta de Santiago Ramón y Cajal referente a cómo las experiencias de aprendizaje alteran la fortaleza y eficiencia de las conexiones sinápticas entre células interconectadas de manera precisa, una idea que se engloba en el concepto de “plasticidad sináptica” y que ha recibido un fuerte soporte experimental (Kandel, 2001). En vertebrados, invertebrados y cultivos, se ha comprobado que existen cambios sinápticos de corto y largo plazo, de manera análoga con los procesos temporales de la memoria, cuyos mecanismos difieren en aspectos particulares; mientras que las modificaciones sinápticas de corto plazo involucran modificaciones covalentes de proteínas preexistentes, las alteraciones sinápticas de largo plazo involucran la activación de la expresión de genes, síntesis de nuevas proteínas y la formación de nuevas conexiones (Kandel, 2012; Kandel & Schwartz, 1982). Para ambos tipos de modificaciones, sin embargo, es necesaria la actividad de segundos mensajeros y su unión a proteínas cinasas, eventos que regulan la liberación del neurotransmisor de las células involucradas en el aprendizaje y los cambios en el tamaño de los potenciales sinápticos (Kandel & Schwartz, 1982).

Estudios que se han valido del uso de herramientas genéticas han determinado cómo diferentes fuentes de información, entendidas como mensajeros moleculares, activan vías de señalización intracelular que son integradas en el núcleo, activando o reprimiendo genes, para

modular de manera específica la formación de la memoria a través de cambios morfofuncionales (Guan et al., 2002). Así, la MLP es representada a nivel celular por la modulación dependiente de actividad de las conexiones sinápticas que, a su vez, dependen de la activación de procesos transcripcionales y traduccionales que favorecen el fenómeno de sinaptogénesis (Kandel, 2012). Según Kandel (Kandel, 2012; Asok, Leroy, Rayman & Kandel, 2019), la generación de nuevas sinapsis puede representar la fase final y más estable del almacenamiento de la MLP, pues representaría un aumento en la eficiencia de comunicación intercelular de los circuitos implicados en el aprendizaje.

Existe una amplia evidencia experimental que apoya la hipótesis de la síntesis de proteínas como sustrato de la MLP; a pesar de ello, se han descrito condiciones particulares en las que esta propuesta es incapaz de explicar la formación de la memoria. Condiciones en las que el aprendizaje resulta de entrenamientos con una alta intensidad, en estimulación o en número de sesiones, han mostrado ejercer un efecto protector en contra de inhibidores de los procesos de expresión génica (Díaz-Trujillo, Contreras, Medina, Silveyra-León, Antaramian, Quirarte & Prado-Alcalá, 2009; Medina, Torres-García, Rodríguez-Serrano, Bello-Medina, Quirarte, McGaugh & Prado-Alcalá, 2019; González-Franco, Bello-Medina, Serafín, Prado-Alcalá & Quirarte, 2019; Prado-Alcalá, González-Salinas, Antaramian, Quirarte, Bello-Medina & Medina, 2020). Si la síntesis de proteínas es un proceso esencial para consolidar la memoria, su bloqueo tendría que derivar en un detrimento de esta (amnesia); la negación de esta proposición en condiciones de aprendizaje incrementado ha llevado a cuestionarse acerca de los mecanismos moleculares que subyacen a su consolidación, que, tentativamente, tendrían que ser disímiles a los requeridos en situaciones de aprendizaje moderado por su dependencia de procesos genómicos.

1.2. Aprendizaje incrementado

El aprendizaje incrementado se entiende a través de dos facetas: el sobreentrenamiento, que está mediado por un número de sesiones de entrenamiento mayor al necesario para alcanzar una asíntota en una curva de aprendizaje, y, el sobrerreforzamiento, que es un aprendizaje mediado por una alta estimulación aversiva (Prado-Alcalá et al., 2012). En estas situaciones, se ha visto que el bloqueo de la actividad neuronal, a través de diversos tratamientos, no genera un efecto amnésico como en las situaciones de aprendizaje moderado (Prado-Alcalá & Cobos-Zapíaín, 1977; 1979; Salado-Castillo, Sánchez-Alavéz, Quirarte,

Martínez-García & Prado-Alcalá, 2011; Giordano & Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989). Esto, en otras palabras, significa que el aprendizaje incrementado, sea por sobreentrenamiento o sobrerreforzamiento, permite que la información aprendida se almacene a largo plazo aún con la interferencia del funcionamiento cerebral (Véase Tabla 1). Lo anterior se ha probado en diferentes especies animales, utilizando reforzadores negativos y positivos, en diferentes tipos de tareas y en diferentes regiones cerebrales (para una revisión, véase Prado-Alcalá et al., 2012). Cabe destacar que a pesar de que se han utilizado diferentes tipos de tareas para estudiar este fenómeno (tarea de alternancia espacial, presión de palanca bajo programas de reforzamiento continuo, laberinto acuático de Morris, evitación activa), la mayor parte de la evidencia experimental se ha obtenido utilizando la tarea de evitación inhibitoria (EI) por las ventajas que presenta.

En esta tarea, los sujetos asocian un contexto con la descarga de un choque eléctrico; basta una sola presentación del estímulo aversivo para que se dé el aprendizaje de evitación, entendido como el nivel de inhibición de la conducta exploratoria que, en principio, acerca al sujeto al contexto de castigo. El que la tarea requiera de una sola sesión de entrenamiento permite que se discrimine entre los procesos de adquisición, consolidación y evocación de la memoria, pudiéndose controlar la manipulación experimental del proceso de interés sin que haya interferencia entre uno y los otros (Abel & Lattal, 2001). Otra de sus bondades es que la intensidad del choque eléctrico puede ser modulada, lo que permite generar trazos de memoria de distinta fortaleza; así, con un choque bajo se pueden estudiar los efectos de facilitación de determinados tratamientos, como lo hizo Medina y col. (2007) al evaluar el papel neuromodulatorio de la corticosterona en la formación de la memoria; con un choque moderado, el papel de la síntesis de proteínas en diferentes tiempos; o bien, con un choque de alta intensidad, el efecto protector en contra de tratamientos amnésicos. Considerando lo anterior, en lo que sigue de este apartado se presentan referencias que utilizaron como paradigma conductual la tarea de EI.

Autores	Sistema evaluado	Región
Bello-Medina et al., 2016	Espinogénesis	Estriado
Giordano et al., 1986	Acetilcolina	
González-Franco et al., 2017	Arc	
González-Franco et al., 2019	Serotonina/síntesis de proteínas	
Pérez-Ruiz & Prado-Alcalá, 1989	Canales de sodio	
Salado-Castillo et al., 2011	Canales de sodio	
Cobos-Zapiaín et al., 1996	GABA	Sustancia nigra
Salado-Castillo et al., 2011	Canales de sodio	
Salado-Castillo et al., 2011	Canales de sodio	Amígdala
Torres-García et al., 2017	Canales de sodio	Corteza Prefrontal Medial
Medina et al., 2019	Síntesis de proteínas	Hipocampo
Cruz- Morales et al., 1992	Acetilcolina	Inyecciones sistémicas
Cruz-Morales et al., 1993	GABA	
Díaz-Trujillo et al., 2009	Síntesis de proteínas	
Durán et al., 1990	Acetilcolina	
Prado et al., 1994	Acetilcolina	
Solana-Figueroa et al., 2002	Serotonina	

Tabla 1. Referencias sobre el estudio del sobrerreforzamiento.

Díaz-Trujillo et al. (2009), analizaron el efecto del inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida sobre las latencias de retención de animales con diferentes intensidades de entrenamiento. Los autores reportan que la administración sistémica y post-entrenamiento del fármaco produce amnesia en aquellos grupos que recibieron un choque eléctrico de baja intensidad, en concordancia con lo observado en otros trabajos (e.g. Igaz et al., 2002); en contraposición, no se encontró deterioro en aquellos que recibieron una descarga más intensa. Dado que se ha visto que hay una aceleración del proceso de consolidación por estimulaciones aversivas altas (Parent & McGaugh, 1994), los autores replicaron el experimento administrando la cicloheximida 30 min antes del entrenamiento, tiempo en el que mostraron el fármaco tenía mayor eficiencia inhibitoria. Nuevamente, se encontró el efecto protector del entrenamiento intenso, demostrando con ello que los efectos encontrados no se deben a un fenómeno de aceleración de la consolidación. Además, se llevaron a cabo experimentos para demostrar que estos resultados no se debían a alteraciones de la actividad motora, a

interferencia con el proceso de adquisición o a un efecto de dependencia de estado. En vista de lo obtenido, en el trabajo se cuestiona el papel de la síntesis de proteínas como requisito para la consolidación en situaciones de aprendizaje incrementado y concluyen que un choque de alta intensidad es capaz de activar sistemas de modulación que contrarrestan los efectos, directos o indirectos, de los PSIs que causan la pérdida de la memoria.

Otros estudios han llegado a conclusiones similares al administrar el inhibidor anisomicina en el hipocampo (Medina et al., 2019) y en el estriado dorsal (González-Franco et al., 2019). En el trabajo de Medina et al. (2019), infundieron bilateralmente en el hipocampo dorsal DRB, bloqueador de síntesis de mRNA y el PSI anisomicina, en grupos independientes. Para los grupos de ambas condiciones, la descarga intensa no produce amnesia, lo que lleva a los autores a pensar que los mecanismos transcripcionales ni los traduccionales son necesarios para la formación de memorias altamente aversivas; proponen que el entrenamiento induce la liberación de corticosterona y que ésta, por mecanismos no-genómicos, favorece cambios en la arquitectura de las neuronas que resultan suficientes para el desarrollo de la MLP. González-Franco et al. (2019), al encontrar los mismos resultados en el estriado dorsal, arguyen que la anisomicina genera efectos secundarios que, por sí solos, pueden explicar el deterioro de la memoria en condiciones moderadas. Dando apoyo a esta idea, en su trabajo se demuestra que la administración de la anisomicina sin entrenamiento induce un incremento en la concentración de 5-HT de más del 200% respecto a un grupo control; como se describe en la literatura, el aumento de este neurotransmisor produce amnesia en los aprendizajes de evitación (Solana et al., 2002).

Además de poner a prueba la hipótesis de que la síntesis de proteínas es necesaria para la consolidación de la memoria, los estudios de aprendizaje incrementado también se han centrado en diferentes sistemas de neurotransmisión relacionados con el proceso de consolidación. La aplicación sistémica o localizada (estriado antero-dorsal) de antagonistas colinérgicos (atropina/escopolamina) deteriora la retención de la memoria de entrenamientos de baja intensidad, mientras que éstos resultan inocuos en entrenamientos intensos (Cruz-Morales, Durán-Arévalo, Díaz del Guante, Quirarte & Prado-Alcalá, 1992; Durán-Arévalo, Cruz-Morales & Prado-Alcalá, 1990; Giordano et al., 1986). De la misma manera, en la sustancia nigra *pars compacta* (SNc) se ha visto que antagonistas GABAérgicos (bicuculina/picrotoxina) no producen efecto de deterioro en animales entrenados con un choque alto. Esto implica que varios sistemas de neurotransmisión están involucrados simultáneamente, de tal modo que, en situaciones de aprendizaje incrementado, aun cuando uno de ellos sea bloqueado, la

actividad de otros sistemas será suficiente para mantener la información adquirida (Cruz-Morales et al., 1992). La misma conclusión puede aplicarse para las diferentes estructuras implicadas en el almacenamiento de información, de donde se deriva un modelo que predice que, después de un aprendizaje incrementado, la interferencia de una o varias estructuras no producirá las deficiencias mnémicas esperadas debido a una distribución difusa de la actividad fisiológica que será suficiente para integrar y almacenar la información, tal como en las condiciones de normalidad (Prado-Alcalá, 1995). Un estudio del 2011 dio apoyo a este modelo, mostrando que la inactivación concurrente de la amígdala-estriado, amígdala-sustancia nigra o el estriado-sustancia nigra resultaba inefectiva para alterar la formación de la memoria cuando un choque relativamente alto (3.0 mA) era administrado (Salado-Castillo et al., 2011).

En la búsqueda de la caracterización del sobrerreforzamiento, Cruz-Morales et al. (1992) añadieron más datos descriptivos al llevar a cabo un estudio que pretendía determinar si el efecto protector se conseguía de manera gradual o si se presentaba una vez alcanzado un umbral. Los autores abordaron este problema administrando de manera sistémica y post-entrenamiento el antagonista colinérgico escopolamina en grupos independientes cuyos entrenamientos diferían por un incremento del choque eléctrico de una décima parte de un miliamperio entre uno y otro. Al analizar la retención de ratas entrenadas con 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 y 3.0 mA se observó que los tres grupos entrenados con una menor intensidad de choque presentaban amnesia por efecto de la escopolamina, en contraste con el resto de los grupos que presentaban el efecto protector, es decir, una óptima memoria, resultados que sugieren que los mecanismos que contrarrestan los efectos negativos del antagonista se activan al alcanzarse un umbral de estimulación aversiva.

Los estudios hasta aquí descritos han abordado de manera operacional el problema del aprendizaje incrementado a través del efecto protector que se presenta en contra de tratamientos amnésicos; otra manera de definirlo operacionalmente es por la alta resistencia a la extinción que estos aprendizajes generan. La extinción, en este caso, se refiere al decremento progresivo en las latencias de retención por la ausencia del estímulo aversivo; dado que la resistencia a la extinción refleja la fortaleza del aprendizaje, se puede utilizar como medida comparativa entre experiencias de diferente intensidad. Así, se ha visto un patrón diferencial producido por choques de diferente magnitud, en donde a sujetos entrenados con 3.0 mA les toma más tiempo para extinguir su conducta respecto a sujetos con entrenamiento de 1.0 o 2.0 mA (Garín-Aguilar, Díaz-Cintra, Quirarte, Aguilar-Vázquez, Medina & Prado-Alcalá,

2012; Bello-Medina, Flores, Quirarte, McGaugh & Prado-Alcalá, 2016; González-Franco, Ramírez-Amaya, Joseph-Bravo, Prado-Alcalá & Quirarte, 2017).

Como se mencionó al inicio, la memoria está constituida por múltiples sistemas que, de acuerdo con lo descrito en la literatura, están mediados por estructuras cerebrales particulares. El hipocampo, por ejemplo, está relacionado con la adquisición y almacenamiento de información espacial y el establecimiento de relaciones entre estímulos; la amígdala, con la adquisición de conductas basadas en eventos que tienen propiedades afectivas y que resultan biológicamente significativos; y, el estriado, con el reforzamiento de asociaciones entre respuestas y estímulos ambientales (McDonald & White, 1993; White & McDonald, 2002). Estos tres componentes (espacial, emocional y motor) están implicados en la tarea de EI, pues, como se vio, la interferencia con cualquiera de las estructuras asociadas a los mismos impide la formación de la memoria en situaciones de aprendizaje moderado. El hecho de que los tratamientos amnésicos resulten inocuos en situaciones de aprendizaje incrementado no implica que las mismas estructuras dejen de ser relevantes para el procesamiento, integración y almacenamiento de la información adquirida, sino que su actividad en paralelo es tal que alcanza un umbral que permite contrarrestar los efectos negativos de los tratamientos sobre la memoria. En este sentido, el estudio de cualquiera de estas estructuras en cuanto al problema del aprendizaje incrementado estaría aportando datos relevantes para su entendimiento. En el presente trabajo, el interés se centra en el papel del estriado por los hallazgos moleculares y de plasticidad que recientemente se han hecho en referencia a la intensidad del entrenamiento en esta región, por lo que a continuación se trata esta estructura desde una perspectiva de conexión, función y relación con el sobrerreforzamiento de una manera más detallada.

2. Estriado

El estriado es el principal núcleo de entrada de los ganglios basales (GB). Además del estriado, forman parte de los GB el globo pálido (externo e interno), el núcleo subtalámico y la sustancia nigra (pars compacta y reticulata). Sus núcleos de salida son el globo pálido interno (GPi) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr), quienes reciben aferencias directas del estriado e indirectas a través del globo pálido externo (GPe) y núcleo subtalámico (STN). En conjunto, los GB son estructuras subcorticales que reciben aferencias glutamatérgicas de las neuronas piramidales de la mayor parte de la corteza; funcionan como centros integradores de información que pueden reorganizar los patrones de actividad entrante antes de distribuirla a otras estructuras que forman parte de los sistemas efectores de la conducta, tales como el tálamo, que envía proyecciones a regiones frontales de la corteza involucradas en la planeación y la ejecución motora; regiones del mesencéfalo como los colículos superiores, encargados del movimiento ocular; el núcleo pedúnculo-pontino, relacionado con la dirección del movimiento y con núcleos hipotalámicos, asociados con el funcionamiento autonómico (Gerfen & Bolam, 2017; Graybiel, 1990). Las principales funciones con las que se les ha relacionado son con el control motor, establecimiento de hábitos, generación de aprendizajes asociativos estímulo-respuesta y con conductas dirigidas a metas (Packard & Knowlton, 2002). Los GB actúan en paralelo con otros sistemas de salida de la corteza, por esta razón se investiga si tienen un papel primario o modulador en la generación de la conducta.

2.1. Organización: proyecciones y tipos celulares

La mayor entrada a estos sistemas proviene de las neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza (McGeorge & Faull, 1989). El sistema corticoestriatal está dado por proyecciones de las neuronas intratelencefálicas (IT), cuyos núcleos se encuentran en la superficie de la capa 5 de la corteza, y por las neuronas del tracto piramidal (TP), localizadas primordialmente en las zonas más profundas de la capa 5 de la corteza frontal. Ambos tipos de neuronas se diferencian por su distribución axonal; las neuronas IT poseen colaterales axónicas en el estriado y la corteza, mientras que las del TP proyectan hacia el tallo cerebral y la médula espinal, pero tienen colaterales en el estriado. Se ha establecido que estas entradas están organizadas de una manera topográfica, en donde se mantiene una relación espacial y funcional entre las porciones de la corteza que envían proyecciones y los territorios del estriado que las reciben (Alexander, DeLong, & Strick, 1986; Alexander & Crutcher, 1990; Nambu, 2011;

Romanelli, Esposito, Schaal & Heit, 2005). Considerando esta idea, se han descrito diferentes circuitos que van de la corteza a los GB y de éstos al tálamo, que, a su vez, proyectan a las mismas áreas de la corteza de donde se originó el circuito (DeLong & Wichmann, 2007); las cortezas cuyas funciones son distintas proyectan a regiones del estriado diferentes, mientras que aquellas que tienen funciones similares proyectan a regiones estriatales comunes de una manera convergente (Nambu, 2011). Los circuitos mejor definidos son el sensoriomotor, que va de las cortezas somatosensoriales, motoras y premotoras al putamen (la porción dorsolateral del estriado) (Kelly & Strick, 2004); el asociativo, que proviene de las áreas asociativas de la corteza y proyectan sobre el núcleo caudado (la porción dorsomedial del estriado) (Romanelli et al., 2005); y el límbico, cuyas proyecciones provienen de la corteza cingulada anterior, la corteza orbito-frontal, la amígdala y el hipocampo, que inervan a la porción ventral del estriado, en la que se incluye al núcleo accumbens (Groenewegen, Vermeulen-Van der Zee, Kortschot & Witter, 1987; Haber, Kunishio, Mizobuchi & Lynd-Balta, 1995; Kunishio & Haber, 1994; Russchen, Bakst, Amaral & Price, 1985) (Véase Figura 3). Este esquema de organización, junto con la visión de los tipos celulares y la interacción de los diferentes sistemas de neurotransmisión en el estriado, ha servido como marco de referencia tanto para investigadores como clínicos interesados en el funcionamiento de los ganglios basales en condiciones normales y patológicas (DeLong & Wichmann, 2007; Graybiel, 1990; Romanelli et al., 2005).

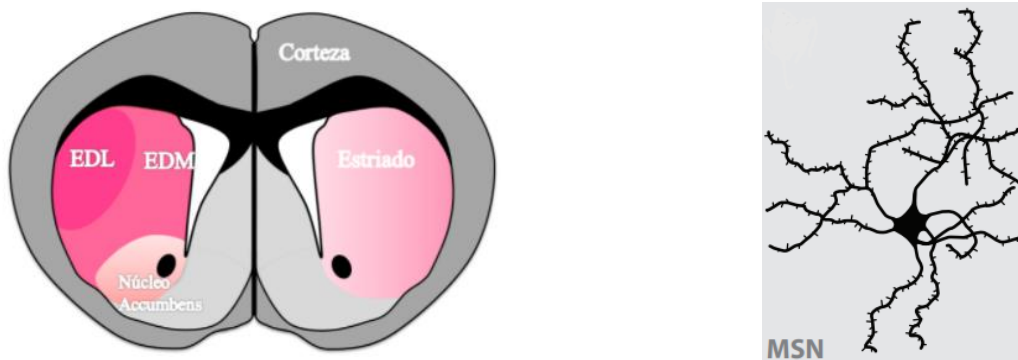


Figura 3. Representación de un corte coronal de cerebro de roedor en donde se muestra la localización del estriado y sus delimitaciones (izquierda). Representación de una neurona espinosa mediana (MSN) (derecha). Modificado de Kreitzer (2009).

La gran mayoría de células nerviosas que componen al estriado (más del 90% del total neuronal) son neuronas espinosas medianas (MSNs), que son células GABAérgicas de proyección con terminaciones axónicas en el GPe, GPi y SNr (Fig. 3). Estas células reciben la principal entrada de las proyecciones excitatorias corticales y talámicas, cuyas terminaciones establecen contactos sinápticos en las cabezas de las espinas dendríticas que caracterizan a las MSNs. Las aferencias excitatorias de las neuronas cortico y tálamo estriatales son integradas junto con la entrada de otros sistemas de neurotransmisión en las MSNs, lo que determina su actividad electrofisiológica (Calabresi, Pisani, Centonze, & Bernardi, 1997; Gerfen & Surmeier, 2011). Tienen la característica de que permanecen en estado silente si no reciben una estimulación sináptica sincronizada y lo suficientemente fuerte para generar un potencial de acción, debido a que estas células poseen un potencial de membrana en reposo bajo (alrededor de -80 mV) y a que no muestran una corriente entrante dependiente de voltaje muy prominente, que no le permite presentar actividad en ráfagas de manera sostenida (Calabresi, Mercuri & Bernardi, 1990; Calabresi, Mercuri, Stefani & Bernardi, 1990; Cepeda, André, Yamazaki, Wu, Kleiman-Weiner & Levine, 2008). Un regulador adicional del disparo de estas células es la inhibición local GABAérgica, que actúa reduciendo la duración y amplitud de las entradas excitatorias del estriado (Calabresi et al., 1990; Koós & Tepper, 1999).

Las otras principales fuentes de información extrínseca provienen, por un lado, de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc) y del área tegmental ventral (VTA), y, por otro, de neuronas serotoninérgicas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el núcleo de rafé dorsal (Fallon & Moore, 1978; German & Manaye, 1993; Lavoie & Parent, 1990; Parent, Wallman, Gagnon & Parent, 2011; Swanson, 1982). Además, también hay entradas de información intrínseca, como las colaterales axónicas intraestriatales de las MSNs, que forman microcircuitos de inhibición lateral, y las dadas por la población neuronal minoritaria del estriado: interneuronas colinérgicas y GABAérgicas sin espinas (Gonzales & Smith, 2016; Tepper & Bolam, 2004). Lo que se pretende puntualizar al describir estos macro y microcircuitos es la convergencia de los sistemas glutamatérgicos, GABAérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos y colinérgicos en las células del estriado que determina la respuesta de integración y patrones de actividad de esta estructura.

Se añade otro nivel de complejidad en la organización estriatal al considerar los hallazgos que indican fenómenos de lateralización. Utilizando métodos estereológicos, se ha encontrado que la densidad neuronal en el caudado-putamen es mayor en el hemisferio izquierdo de ratas respecto al derecho, independientemente del sexo (Meitzen, Pfllepsen,

Stern, Meisel, & Mermelstein, 2011). A nivel de receptores y de conexiones también se han visto diferencias hemisféricas. Se ha visto, por ejemplo, que en el hemisferio izquierdo hay un porcentaje mayor de receptores D2 y una mayor expresión de la subunidad NR2A de los receptores NMDA y del péptido dinorfina (Capper-Loup & Kaelin-Lang, 2008; Capper-Loup, Rebell, & Kaelin-Lang, 2009; Schneider, Murphy, & Coons, 1982). Destaca el hecho de que los patrones de expresión de la dinorfina están regionalizados, pues tienen una mayor expresión en las regiones mediales respecto a las laterales (Capper-Loup & Kaelin-Lang, 2008). Con base en lo anterior, se ha analizado la expresión del componente presináptico vGluT1 en la corteza cingulada, una región con proyecciones hacia el estriado medial; de igual manera que con la dinorfina, se ha encontrado una mayor expresión en el hemisferio izquierdo (Capper-Loup et al., 2009). En conjunto, estos hallazgos pudieran funcionar como marco explicativo para algunas conductas que se han encontrado lateralizadas y que se sabe están mediadas por el estriado.

2.2. Neuromodulación

En las células estriatales, las acciones excitatorias de glutamato e inhibitorias de GABA coexisten con la actividad de otros sistemas de neurotransmisión y neuropéptidos que, en conjunto, adquieren el papel de neuromoduladores (Graybiel, 1990). Una propuesta del efecto de neuromodulación en el estriado indica que sirve como un dispositivo de ganancia de control, ajustando los niveles de actividad de diferentes vínculos de entrada-salida estriatales bajo condiciones particulares, lo que implica que la modulación podría tener efectos funcionales específicos al favorecerse la actividad de un circuito que dirigirá el control de un sistema efector de la conducta (Graybiel, 1990). En esta propuesta se resalta que la concentración de moduladores en el estriado es crucial para proveer los niveles de actividad necesarios en la selección de programas de ejecución.

La dopamina es uno de los sistemas de neurotransmisión que mejor se han estudiado como modulador de la actividad estriatal. Su importancia se revela por el hecho de que las alteraciones en los tractos nigroestriatales que contienen dopamina conllevan a disfunciones motoras y cognitivas, como en la enfermedad de Parkinson o en la corea de Huntington (Albin, Young & Penney, 1989). La mayoría de las terminales dopaminérgicas establecen contactos sinápticos en los cuellos de las espinas dendríticas de las MSNs que, anatómicamente, se encuentran muy cercanas a las conexiones glutamatérgicas de las terminales cortico y tálamo

estriatales ubicadas en las cabezas de las espinas (Calabresi et al., 1990). Esta cercanía les confiere una base de interacción fisiológica a nivel post-sináptico, en donde la dopamina regula la dirección de la excitabilidad de las MSNs dependiendo del tipo de receptor que expresen. Se ha visto que las corrientes entrantes de los canales de NMDA y AMPA de las MSNs con receptores D1 (también llamadas “estriato-nigrales”) incrementan en función de la presencia de agonistas dopaminérgicos, al mismo tiempo que decrecientan las corrientes producidas por GABA, lo que predispone a estas neuronas a la excitación (André, Cepeda, Cummings, Jocoy, Fisher, Yang & Levine, 2010; Flores-Hernández et al., 2002; Surmeier, Ding, Day, Wang & Shen, 2007). De manera contrastante, las MSNs que expresan el receptor D2 (estriato-palidales) presentan un decremento de las corrientes postsinápticas excitatorias por la activación de su receptor dopaminérgico (André et al., 2010; Hernández-Echegaray, Starling, Cepeda & Levine, 2004; Surmeier et al., 2007). Hay evidencia que sugiere que estos efectos se deben a la movilización de endocannabinoides desencadenada por la estimulación de los receptores de dopamina, al modular la liberación de glutamato en las terminales presinápticas (André et al., 2010).

Se ha mostrado que la liberación de dopamina en el estriado no solo se da cuando las neuronas dopaminérgicas disparan potenciales de acción, sino que también se presenta como una consecuencia de la regulación local dada por las interneuronas colinérgicas; esto se determinó por medio del uso de técnicas optogenéticas en las que se activó, aplicando haces de luz, a las interneuronas colinérgicas y, de manera simultánea, registrando terminales dopaminérgicas. En estas manipulaciones se observó un aumento de dopamina concurrente a la activación de las interneuronas e independiente de potenciales de acción a nivel somático (Threlfell, Lalic, Platt, Jennings, Deisseroth & Cragg, 2012). Además de este papel en la regulación dopaminérgica, estas neuronas son importantes moduladores de los patrones de actividad de diferentes tipos celulares en el estriado; un solo disparo de las mismas ejerce un control inhibitorio rápido sobre las entradas glutamatérgicas de las MSNs a través de la estimulación de sus receptores muscarínicos y a través de la activación de las diferentes clases de interneuronas GABAérgicas (Dautan et al., 2020; English et al., 2012; Pakhotin & Bracci, 2007; Sullivan, Chen & Morikawa, 2008). También se sabe que la desregulación de los niveles de acetilcolina en el estriado, al igual que en la dopamina, tiene efectos patológicos (Albin et al., 1989; Graybiel, 1990).

Una proyección importante para las interneuronas colinérgicas es la proveniente de las neuronas serotoninérgicas del núcleo de rafé. Se ha demostrado que estas interneuronas

expresan varios receptores para serotonina y que ésta tiene un potente efecto excitatorio sobre las mismas, aunque la regulación puede variar de acuerdo con la región específica de inervación (Blomeley & Bracci, 2005; Bonsi et al., 2007; Virk, Sagi, Medrihan, Leung, Kaplitt & Greengard, 2016). En un estudio reciente, se comparó el efecto de la serotonina en las regiones dorsales y ventrales del estriado sobre las interneuronas colinérgicas; se encontró que mientras que en las regiones dorsales la serotonina ejerce un efecto despolarizante, en el estriado ventral tiene un efecto opuesto. Los autores apuntan que esta función diferencial pudiera contribuir a especializaciones funcionales en esta estructura (Virk et al., 2016). Las terminales axónicas de las neuronas serotoninérgicas también establecen contactos sinápticos con interneuronas GABAérgicas y con las MSNs, causando en ambas un efecto excitatorio por una reducción de las corrientes de potasio dependientes de voltaje (Blomeley & Bracci, 2009; Park, Gonzales-Vegas & Kitai, 1982; Stefani, Surmeier & Kitai, 1990).

2.3. Estriado y procesos de aprendizaje y memoria

La importancia de los neurotransmisores descritos para el funcionamiento del estriado también se ha puntualizado para los mecanismos de la memoria, así como para diferentes formas de plasticidad sináptica como LTP y LTD (Atallah, López-Paniagua, Rudy & O' Reilly, 2006; Calabresi, Pisani, Centonze & Bernardi, 1997; Sandberg, Sanberg, Hanin, Fisher & Coyle, 1984; Packard & Knowlton, 2002). Se ha mostrado, por ejemplo, que la actividad colinérgica estriatal es fundamental tanto para la adquisición y retención de experiencias de aprendizaje motivadas aversivamente (Sandberg et al., 1984; Prado-Alcalá, 1985), como para condicionamientos instrumentales apetitivos (Prado-Alcalá & Cobos-Zapíaín, 1977; Prado-Alcalá, Bermúdez-Rattoni, Velázquez-Martínez & Bacha, 1978). Asimismo, como parte de los requisitos para la inducción de cambios plásticos en las células del estriado se ha observado el incremento transitorio de neurotransmisores glutamatérgicos y dopaminérgicos, así como la participación de diferentes vías de las proteínas cinasas (Calabresi, Fedele, Pisani, Fontana, Mercuri, Bernardi & Raiteri, 1995; Calabresi, Pisani, Mercuri & Bernardi, 1994).

Por otro lado, diversos estudios de farmacología conductual han aportado evidencia que indica que, pese a la homogeneidad citoarquitectónica del estriado, existe una regionalización funcional que se explica por la procedencia de las proyecciones recibidas. De esta manera, se habla de la participación del estriado dorsolateral (putamen) para la formación de hábitos, del estriado dorsomedial (núcleo caudado) para las conductas dirigidas a metas y de la

importancia del estriado ventral para la asignación de valencias emocionales durante una experiencia de aprendizaje (Atallah et al., 2006; Packard & McGaugh, 1996; Yin, Ostlund, Knowlton, & Balleine, 2005; Yin & Knowlton, 2006).

Teniendo como base estos principios de organización, Bello-Medina y colaboradores (2016) estudiaron el papel diferencial de las regiones del estriado con relación a cambios morfológicos asociados con la intensidad de un entrenamiento. Los autores reportaron que la tarea de EI induce la generación de espinas dendríticas tipo hongo en las neuronas medianas espinosas del estriado dorsomedial de manera dependiente de la intensidad del choque eléctrico usado durante el entrenamiento; estos cambios fueron evidentes a las 6 horas después del entrenamiento y persistieron a las 24 horas. En el trabajo se sugiere que los cambios observados pudieran relacionarse con la activación de receptores a glucocorticoides ya que se sabe que, debido al componente aversivo de la tarea, hay una liberación de corticosterona consecuente al entrenamiento (González-Franco, Ramírez-Amaya, Joseph-Bravo, Prado-Alcalá & Quirarte, 2017; Medina et al., 2007) y que, además, esta hormona es capaz de inducir cambios plásticos como la generación de espinas dendríticas aún en ausencia de la síntesis de proteínas, como se observó en rebanadas de hipocampo (Komatsuzaki et al., 2005, 2012). De manera interesante, la espinogénesis es impedida si de manera simultánea a la corticosterona se administran inhibidores de las vías Erk, MAPK, PKA, PKC y PI3K de manera independiente, lo que sugiere la participación de estas proteínas cinasas en la inducción de cambios estructurales en las neuronas (Komatsuzaki et al., 2012).

Por su parte, Atallah et al. (2006) apuntan sobre la función diferencial de las regiones dorsal y ventral en el condicionamiento instrumental, basados en estrategias farmacológicas. En su trabajo se encontró que el estriado dorsal es responsable de la ejecución de la tarea, pero no de su aprendizaje, mientras que el estriado ventral es responsable tanto del aprendizaje como de la ejecución, por lo que establecen que el estriado ventral “dirige” la actividad del estriado dorsal. Los autores proponen que la mediación entre ambas regiones está dada por las entradas dopaminérgicas del área tegmental ventral y la sustancia nigra, lo que implicaría que la activación del estriado ventral es previa a la del estriado dorsal para que se cumpla la función de “dirección”.

González-Franco et al. (2017), consideraron la división dorsal-ventral para estudiar un posible correlato neurobiológico de un entrenamiento intenso en la tarea de EI en ratas. Estudiaron la expresión de la proteína Arc con diferentes intensidades de entrenamiento. Para los análisis, se realizaron los sacrificios a los 45 min después del entrenamiento. Lo que

observaron fue que un número alto de neuronas expresaron la proteína en las regiones ventrales, pero no así en las regiones dorsales del estriado. Además, observaron que había una mayor expresión en los sujetos con un entrenamiento intenso respecto a los entrenados con un choque moderado. El contraste entre los hallazgos de Bello-Medina et al., (2016) acerca de los cambios morfológicos en la región dorsomedial y los de González-Franco et al., (2017) en la región ventral asociados con el entrenamiento intenso pueden ser explicados por la propuesta de Atallah et al. (2006) respecto a la dinámica temporal de activación del estriado.

El análisis inmunohistoquímico de la proteína CREB fosforilada en sujetos entrenados en la tarea de EI también ha mostrado un patrón de activación predominante de las regiones ventrales respecto a las dorsales, sin embargo, este patrón regionalizado no se relaciona con la intensidad de entrenamiento. Es decir, el entrenamiento induce mayores niveles de CREB fosforilada en el estriado ventral, pero no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de 0.0, 1.0 y 3.0 mA (Alonso-Lorenzo, 2018). Además, se ha reportado que la proporción de núcleos pCREB positivos respecto a los totales es mayor en el hemisferio izquierdo solo en los sujetos entrenados con una intensidad de 1.0 mA, mientras que en el hemisferio derecho se observa una alta proporción de núcleos positivos a pCREB en los grupos de 0.0, 1.0 y 3.0 mA, comparados con un grupo bioterio. Derivado de estas observaciones, se sugiere que la vía modulada por pCREB en el estriado se requiere solo en los sujetos con entrenamiento moderado, no así para el incrementado (Alonso-Lorenzo, 2018). Se desconoce si para otras moléculas también hay una lateralización relacionada con la consolidación de la memoria que responda a diferentes condiciones de entrenamiento.

Resulta, entonces, relevante la consideración del estriado de manera regionalizada al analizarse en términos funcionales. Por dicha razón, en este proyecto se contempla la parcelación de la estructura en sus porciones dorsal-ventral y medial-lateral para fines de análisis, sin dejar de lado el análisis por hemisferios. De los párrafos precedentes, se destaca la convergencia de múltiples sistemas de neurotransmisión que son integrados para la activación de una función particular. Estos sistemas, en conjunto con la señalización intracelular que desencadenan, son primordiales para la plasticidad sináptica asociada a los procesos de aprendizaje y memoria. Una vía de señalización importante para este fenómeno es la desencadenada por la familia de proteínas cinasas C (PKC), por lo que a continuación se explora la estructura, activación y función de sus miembros, así como su relación con el proceso de consolidación.

3. Proteína Cinasa C

Los fosfatos resultan de vital importancia para las células; funcionan como intermediarios metabólicos a través de la conformación de la molécula bioenergética adenosín trifosfato (ATP), y forman parte del esqueleto del material genético permitiendo el establecimiento de enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos de las hebras de DNA y RNA (Westheimer, 1987), solo por citar un par de ejemplos. Además de lo anterior, una plétora de funciones biológicas es regulada mediante el mecanismo de fosforilación, consistente en la adición de un grupo fosfato en residuos de serina, treonina o metionina. La fosforilación genera modificaciones en la estructura o función de las proteínas y se da en respuesta a señales intra y extracelulares. Estas reacciones de adición de fosfatos son catalizadas por las proteínas cinasas, quienes definen en gran medida las vías de señalización intracelular (Manning, Whyte, Martinez, Hunter & Sudarsanam, 2002).

Las proteínas cinasas son clasificadas de acuerdo con la relación evolutiva (determinada por análisis de secuencia) que existe entre sus dominios catalíticos (Manning et al., 2002). El grupo AGC de cinasas es uno de los que presenta mayor conservación en los eucariontes; se expresa ampliamente en animales vertebrados e invertebrados, hongos, plantas, organismos unicelulares y protistas (Arencibia, Pastor-Flores, Bauer, Schulze & Bionde, 2013). En esta clasificación se incluyen a más de 60 miembros representados por diferentes familias, de las cuales las más representativas son las proteínas cinasas dependientes de cAMP (PKA), las proteínas cinasas dependientes de cGMP (PKG) y las proteínas cinasas C (PKC) (Arencibia et al., 2013).

La PKC está ampliamente distribuida en la mayoría de los órganos de mamíferos, siendo el encéfalo uno de los que presenta mayor inmunoreactividad para sus diferentes miembros (Kikkawa, Minakuchi, Takai & Nishizuka, 1983; Wetsel et al., 1992). Comparado con la PKA, la PKC presenta una alta actividad enzimática en el tejido nervioso, considerando la cantidad de enzimas que incorporan 1 pmol de fosfato por minuto en un fosfoceptor (Minakuchi, Takai, Yu & Nishizuka, 1981). Resulta importante señalar que hay PKC tanto en neuronas como en células gliales (Mochly-Rosen, Basbaum & Koshland, 1987) y que, en las neuronas, se ubican mayoritariamente en las membranas del sinaptosoma (Kikkawa et al., 1983). En trabajos de distribución de la PKC, se ha observado que regiones primordiales para la memoria y el aprendizaje (amígdala, hipocampo y estriado) presentan una densidad importante de células positivas a estas proteínas (Saito, Kikkawa, Nishizuka & Tanaka, 1988).

Se ha reportado que en el estriado hay una expresión diferencial de algunas subespecies de la PKC en tipos particulares de neuronas, por ejemplo, la PKC α se encuentra en neuronas colinérgicas mientras que la PKC β -I en neuronas GABAérgicas, lo que posiblemente les confiere un papel funcional particular dependiente del tipo celular (Tanaka & Saito, 1992).

3.1. Estructura y activación

En una cascada de señalización intracelular, la PKC es un efector que responde a segundos mensajeros. Los segundos mensajeros, a su vez, son el producto de un primer efector que responde ante señales extracelulares. La fosfolipasa C (PLC) es ese eslabón entre los eventos extra-intra-celulares (Nishizuka, 1992). Los receptores acoplados a proteínas Gq, al ser estimulados por una diversidad de mensajeros, incluidos neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos, hormonas como vasopresina y angiotensina II, mitógenos y factores de crecimiento, funcionan como activadores de la PLC (Minakuchi et al., 1981; Smrcka, Hepler, Brown & Sternweis, 1991). En su forma activa, la PLC hidroliza fosfatidilinositol bifosfato (PI_2), de cuya catálisis se obtienen los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). Este último estimula receptores en el retículo endoplásmico, lo que ocasiona la liberación de Ca^{2+} intracelular (Berridge, 2009). Como veremos, el DAG y el Ca^{2+} son los cofactores necesarios para la activación de la PKC.

Los miembros de la familia de proteínas cinasas C son codificados por 9 genes. De la codificación de estos se obtienen 10 isoformas que constituyen la familia de las PKC (Callender & Newton, 2017). De acuerdo con su estructura y a la dependencia particular de cofactores para su activación, se han clasificado en tres subgrupos: PKC convencionales (cPKC), PKC novedosas (nPKC) y PKC atípicas (aPKC) (Véase Figura 4). Las isoenzimas α , β -I, β -II, y γ conforman al grupo de cPKC. Estas proteínas son activadas por Ca^{2+} , diacilglicerol (DAG) y fosfatidilserina (PS). Las isoenzimas δ , ϵ , η y θ forman el conjunto de las nPKC y su activación depende de DAG y PS. Por su parte, las formas atípicas ι/λ y ζ no requieren de Ca^{2+} o DAG para ser activadas; se sabe que su activación está mediada por ceramida e interacciones proteína-proteína (Newton, 1995; 2001).

Estructuralmente, las PKC están constituidas por un dominio regulatorio (C1, dominio de unión a DAG y PS; y C2, dominio de unión a Ca^{2+}) y uno catalítico (C3, dominio de unión a ATP; y C4, dominio de unión a la proteína sustrato), que se encuentran separados por regiones variables específicas de las isoenzimas (Steinberg, 2008). Los dominios catalíticos están

conservados en todas las isoformas, mientras que los dominios regulatorios tienen variabilidad; esto explica la respuesta particular de activación por diferentes cofactores (Newton, 2001). Las nPKC tienen un tiempo de activación más corto respecto a las cPKC debido a que solo responden de forma endógena a DAG; su región C2 carece del sitio de unión a Ca^{2+} por lo que su activación no está determinada por esta molécula (Shirai & Saito, 2002).

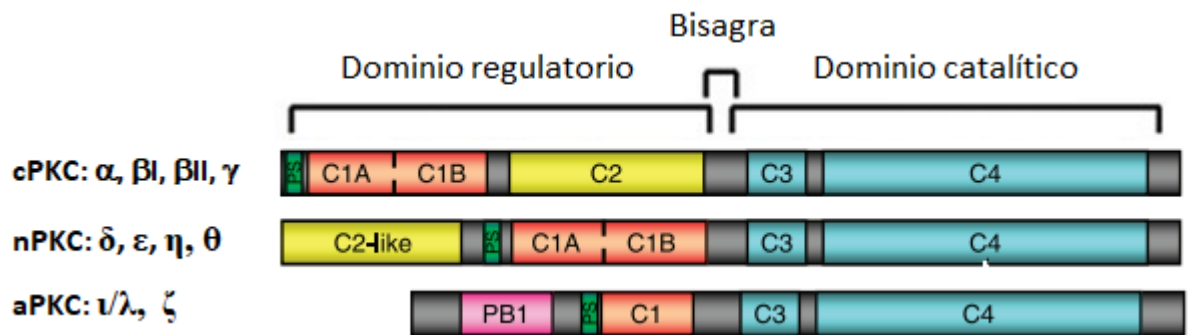


Figura 4. Representación de la estructura de las tres clases de PKC (modificado de Steinberg, 2008).

De acuerdo con una serie de trabajos derivados del laboratorio de Wonhwa Cho, los mecanismos de activación de las diferentes isoformas están determinados por la afinidad al DAG y por la flexibilidad conformacional de sus dominios (Ananthanarayanan, Stahelin, Digman & Cho, 2003; Bittova, Stahelin & Cho, 2001; Stahelin, Digman, Medkova, Ananthanarayanan, Rafter, Melowic & Cho, 2004; Stahelin, Digman, Medkova, Ananthanarayanan, Melowic, Rafter & Cho, 2005a). En el modelo de Stahelin et al. (2005b) sobre la activación de la cPKC α , se resalta el papel del dominio regulatorio para posibilitar la interacción proteína-membrana. El contacto entre el dominio C2 y el Ca^{2+} intracelular incrementa la afinidad de la proteína por las membranas. De manera inicial, la ubicación membranal de la enzima se da por interacciones electrostáticas de baja afinidad, suficientes para que se comience con el proceso de anclaje que es mediado por la PS. La PS rompe las interacciones interdominio que se establecen entre C2 y C1A, permitiendo así a este último penetrar en la bicapa lipídica y unirse al DAG. Las fuerzas de interacción bajas de C1A y C2 se suman y crean una alta afinidad por la membrana, la cual genera un cambio conformacional que ocasiona que el pseudo-sustrato inhibitorio se libere del sitio de unión a sustrato del dominio catalítico, resultando en la activación de la proteína. La activación de esta isoenzima se diferencia de la de la PKC γ en que la segunda tiene una mayor afinidad por DAG, por lo

que puede ser translocada de manera rápida a la membrana plasmática (Ananthanarayanan et al., 2003).

Respecto a las nPKC, se ha reportado que la activación difiere en algunos aspectos entre sus diferentes isoformas. La PKC δ requiere, al igual que las PKC convencionales, de la PS para que se interrumpan las interacciones del dominio C1A con el dominio C2 (Stahelin et al., 2004). Por su parte, el dominio C1 de la PKC ϵ interactúa con el DAG sin necesidad de esta interrupción de la PS. Además, la localización de esta última isoenzima no está limitada a la membrana plasmática, sino que también se puede ubicar en la membrana nuclear (Stahelin et al., 2005a). Si bien el dominio C2 se ha asociado con el Ca^{2+} intracelular, su funcionamiento no es exclusivo de éste ya que se ha visto que puede responder en presencia de moléculas como el ácido fosfatídico, araquidónico, retinoico o inositol bifosfato (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2010).

Además de los cofactores descritos, la actividad catalítica de la PKC también es regulada por mecanismos de “maduración” necesarios para convertir a la enzima en una proteína competente. Estos mecanismos consisten en una fosforilación y dos autofosforilaciones en regiones que están conservadas en la mayoría de las isoformas (Newton, 2001; Shirai & Saito, 2002). La vía inicial de maduración es una fosforilación en el loop de activación ubicado en la T500, cuyo efecto es la alineación del sitio activo (turn motif) permitiendo su autofosforilación en la T641 y en el sitio hidrofóbico (hydrophobic motif), ubicado en la mayoría de las isoenzimas en la S660, con excepción de los miembros atípicos y de la PKC γ (Newton, 2001). Las enzimas fosforiladas en el sitio hidrofóbico tienen un peso de 80 kDa y son las que se encuentran en el espacio citosólico (Keranen, Dutil & Newton, 1995). Cabe destacar que las fosforilaciones en estos sitios no indican que la proteína esté en su forma activa, sin embargo, son el pre-requisito para su activación (Keranen, et al., 1995), por lo que se han utilizado para determinar la presencia de la proteína en manipulaciones inmunohistoquímicas (Busquets-García, Gomis-González, Salgado-Mendialdúa, Galera-López, Pughermanal, Martín-García, Maldonado, & Ozaita, 2018; Sweatt, Atkins, Johnson, English, Roberson, Chen, Newton, & Klann, 1998).

3.2. Relación con procesos de aprendizaje y memoria

Las funciones de la PKC en el sistema nervioso central están asociadas con procesos de transmisión sináptica, incluyendo vesiculación y liberación de neurotransmisores (Okada,

Zhu, Yoshida, Hirose & Kaneko, 2004; Stevens & Sullivan, 1998), apertura y cierre de canales iónicos (Chen, Cantrell, Messing, Scheuer & Catterall, 2005), plasticidad sináptica (Calabrese & Halpain, 2005; Pastalkova, Serrano, Pinkhasova, Wallace, Fenton & Sacktor, 2006) y con procesos de aprendizaje y memoria (Álvarez-Jaimes, Betancourt, Centeno-González, Feliciano-Rivera, Rodríguez, Peña de Ortíz, & Maldonado-Vlaar, 2004; Bank, DeWeer, Kuzirian, Rasmussen & Alkon, 1988; Hongpaisan, Xu, Sen, Nelson & Alkon, 2013; McPhie, Matzel, Olds, Lester, Kuzirian & Alkon, 1993; Olds, Golski, McPhie, Olton, Mishkin & Alkon, 1990; Van der Zee, Compaan, Bohus & Luiten, 1995).

Evidencia derivada de diversos estudios apunta a que la activación de la PKC es un mecanismo conservado en la escala filogenética para permitir el almacenamiento de información, pues se ha observado la relevancia de su actividad al realizar tareas de aprendizaje tanto en especies de invertebrados, incluidos la babosa marina *Hermisenda crassicornis* (Kuzirian, Epstein, Gagliardi, Nelson, Sakakibara, Taylor, Scioletti, & Alkon, 2006; McPhie et al., 1993), el caracol de estanque *Lymnaea stagnalis* (Rosenegger & Lukowiak, 2010; 2013) y la abeja *Apis mellifera* (Grünbaum & Müller, 1998), así como en diferentes especies de vertebrados (Bank et al., 1988; Hongpaisan et al., 2013; Olds et al., 1990; Noguès, Micheau & Jaffard, 1994).

También se ha analizado el papel de la PKC considerando diferentes tipos de aprendizajes y metodologías. En *Hermisenda*, por ejemplo, se utilizó el activador de la PKC briostatina en un condicionamiento pavloviano, en donde se asoció una luz con un estímulo rotacional que provoca contracción. Estas manipulaciones permitieron observar que la administración de briostatina a bajas concentraciones mantiene la información del entrenamiento por más tiempo, de manera que un entrenamiento que por sí solo no genera una memoria de largo plazo (de 4 a 6 eventos de entrenamiento pareado) induce una memoria que persiste hasta por 5 días cuando se acompaña con la administración del activador (Kuzirian et al., 2006). En el caracol y la abeja se ha estudiado la PKC en condicionamientos operantes. Para el caso del caracol, se ha visto que la inhibición farmacológica de la PKC impide la reducción del comportamiento respiratorio aéreo observado tras una estimulación táctil recurrente en sujetos control (Rosenegger & Lukowiak, 2010). En el caso de las abejas se ha visto que la actividad de la PKC en condicionamientos de olfacción de múltiples ensayos es mayor respecto a la inducida por ensayos únicos; este incremento se observa una hora después del entrenamiento y se mantiene hasta por 3 días (Grünbaum & Müller, 1998).

En roedores se han hecho estudios de condicionamiento clásico y operante; especialmente se ha estudiado la participación de esta proteína en tareas dependientes del hipocampo. Un ejemplo de ello es el trabajo de Bonini et al. (2007) en el que demostraron que la administración de inhibidores de la PKC en la región CA1 del hipocampo impide tanto la adquisición como la consolidación de la memoria en sujetos entrenados en el laberinto acuático de Morris. En esta estructura también se ha observado que después del entrenamiento en tareas de condicionamiento de miedo de un solo ensayo y en tareas de discriminación espacial hay una redistribución de la proteína en la célula (lo que refleja el fenómeno de translocación de la proteína) y un incremento de substratos fosforilados específicos de la PKC que se mantiene hasta por 72 h (Noguès et al., 1994; Young, Cesena, Meiri & Perrone-Bizzozero, 2002).

En sujetos entrenados en la tarea de EI se ha reportado un incremento en la fosforilación de la proteína GAP-43, un substrato específico de la PKC asociado a plasticidad y crecimiento celular, en las membranas del sinaptosoma hipocampal (Cammarota, Paratcha, Levi de Stein, Bernabeu, Izquierdo & Medina, 1997). Holahan & Routtenberg (2008) estudiaron esta proteína utilizando ratones transgénicos con mutaciones en los sitios de fosforilación de la PKC. Los ratones fueron entrenados de manera inicial en la versión declarativa (*win-shift*) del laberinto radial y después se cambió a la versión estímulo-respuesta (*win-stay*); los autores evaluaron el número de días que los ratones requerían para cambiar de estrategia. Se observó que los sujetos con sobreexpresión de la GAP-43 permanentemente pseudofosforilada (G-perm) requerían de un mayor número de días para adaptarse al cambio respecto a los ratones silvestres y a aquellos con sobreexpresión de la proteína nativa. Más aún, utilizaron el condicionamiento de miedo al contexto para evaluar la conducta de congelamiento a lo largo de varios días; observaron que los ratones G-perm presentan un mayor porcentaje de congelamiento en el día de prueba de retención respecto a todos los grupos y que esta conducta es resistente a la extinción, pues se mantenía aún a los 70 días después del entrenamiento. Por lo anterior, en el artículo se concluye que los ratones G-perm generan conductas persistentes, difíciles de extinguir e inflexibles al cambio. Estos hallazgos, en conjunto con lo descrito por Kuzirian et al. (2006), apuntan a que la actividad de la PKC se relaciona con la permanencia de la información en el tiempo.

Como se mencionó en el apartado de memoria, la preservación de la información derivada de una experiencia de aprendizaje requiere de cambios plásticos que hagan más eficiente la comunicación interneuronal. La potenciación y depresión a largo plazo, fenómenos

derivados de la estimulación transitoria de los receptores de superficie neuronales, son ejemplos que implican cambios duraderos a nivel bioquímico y fisiológico. La activación de la PKC es uno de los efectos bioquímicos asociados a la plasticidad por estimulación neuronal, y se ha visto tanto a nivel pre como postsináptico a través de la fosforilación de sus substratos (Chen Sweatt & Klann, 1997; Ramakers, Pasinelli, Hens, Gispen & Graan, 1997; Sen, Hongpaisan, Wang, Nelson & Alkon, 2016). Con manipulaciones inmunohistoquímicas, se ha observado el incremento de actividad a los 60 min después de la estimulación y se ha determinado que éste es dependiente de los receptores glutamatérgicos NMDA (Kim, Lee, Shin, Seol, Han, Yee, Kim & Min, 2013; Sweatt et al., 1998).

Existe una clara relación de la PKC con procesos de almacenamiento de información. Su estudio en el campo de la memoria es de interés debido a los hallazgos de conservación funcional que presenta en diferentes especies de animales. En el sistema nervioso central de mamíferos resulta de relevancia por su participación en procesos de transmisión y plasticidad sináptica. El hipocampo es la región en la que se ha estudiado de manera mayoritaria; sin embargo, es poco lo que se sabe acerca de su función en el estriado. Se desconoce si hay un incremento o decremento de proteínas maduras (fosforiladas en las regiones conservadas) en la ventana temporal de consolidación de la memoria y si estos cambios se presentan de manera regionalizada en el estriado. La regionalización de esta estructura analizada a través de los niveles de PKC fosforilada es un primer acercamiento para entender los mecanismos moleculares involucrados en la consolidación de aprendizajes aversivos derivados de un entrenamiento de alta intensidad. Por lo anterior, en este trabajo se plantea la pregunta: *¿el sobrerreforzamiento en la tarea de evitación inhibitoria modificará los niveles de PKC fosforilada en la S660 en diferentes regiones del estriado?*

III. JUSTIFICACIÓN

El entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en el fenómeno del sobrerreforzamiento es tanto de interés teórico como clínico. Desde la perspectiva teórica, resulta relevante conocer las formas en las que se consolida la información bajo condiciones particulares, incluidas condiciones de estrés intenso; esto con el objetivo de tener una comprensión amplia de los procesos mnémicos a nivel fisiológico. Los hallazgos del efecto protector en contra de tratamientos amnésicos sugieren que la consolidación es distinta en condiciones de aprendizaje incrementado respecto a las del aprendizaje moderado. Las

diferencias en términos moleculares entre una condición y otra es materia en la que aún la información es escasa, por lo que su búsqueda resulta esencial. Por otro lado, está bien documentado que la persistencia de información de eventos aversivos es una característica diagnóstica para determinadas patologías, tal como el trastorno de estrés postraumático (Careaga, Girardi, & Suchecki, 2016; Desmedt, Marighetto, & Piazza, 2015), por lo que desde una perspectiva clínica es de gran relevancia la identificación de los participantes en la dinámica molecular involucrados en el mantenimiento de información aversiva, con miras al tratamiento y prevención de enfermedades.

Además de lo anterior, el estriado es una región en la que poco se ha estudiado la participación de la PKC en procesos de aprendizaje y memoria. Determinar los niveles de la PKC fosforilada en la S660 a través de medidas como área de señal, densidad óptica relativa y densidad integrada después de un aprendizaje aversivo dado por diferentes intensidades de estimulación, puede dar luz acerca de los mecanismos moleculares que subyacen al sobrerreforzamiento. De esta manera, con los resultados derivados de esta investigación se tendrá un panorama más amplio de los sustratos neurobiológicos que permiten la formación de la memoria de largo plazo en condiciones de aprendizaje incrementado.

IV. OBJETIVOS

General:

Determinar si el sobrerreforzamiento en la tarea de EI modifica los niveles de PKC fosforilada en la S660 en diferentes regiones del estriado.

Específicos:

1. Evaluar la latencia de retención (memoria) en ratas entrenadas con intensidades de choque eléctrico de 1.0 mA y 3.0 mA en la tarea de EI.
2. Evaluar el efecto del entrenamiento dado con intensidades de choque eléctrico de 1.0 mA y 3.0 mA en la tarea de EI sobre el área de señal, la densidad óptica relativa y la densidad integrada de la PKC fosforilada en la S660 en el estriado dorsal y ventral de ratas, así como en sus regiones mediales, centrales y laterales.
3. Evaluar si existen diferencias interhemisféricas en los niveles de PKC fosforilada en la S660 asociadas con la intensidad del entrenamiento.

V. HIPÓTESIS

1. El entrenamiento en la tarea de EI inducirá latencias de retención altas tanto en sujetos entrenados con 1.0 mA como en sujetos entrenados con 3.0 mA.
2. El sobrerreforzamiento en la tarea de EI inducirá un aumento en el área de señal de la PKC fosforilada en la S660 en el estriado ventral de las ratas.
3. El sobrerreforzamiento en la tarea de EI inducirá un aumento en la densidad óptica relativa de la PKC fosforilada en la S660 en el estriado ventral de las ratas.
4. El sobrerreforzamiento en la tarea de EI inducirá un aumento en la densidad integrada de la PKC fosforilada en la S660 en el estriado ventral de las ratas.
5. El entrenamiento en la tarea de EI con 1.0 y 3.0 mA inducirá un mayor aumento en el área de señal, la densidad óptica relativa y la densidad integrada de la PKC fosforilada en la S660 en el hemisferio derecho respecto al del hemisferio izquierdo.

VI. METODOLOGÍA

1. Sujetos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar criadas en condiciones de bioterio y siguiendo las normas éticas internacionales y del Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, sobre el trato de animales de experimentación. Se alojaron en cajas individuales con comida y agua *ad libitum*, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (encendido de luces a las 7:00 am) en el bioterio del laboratorio. Las pruebas conductuales se efectuaron durante la fase de luz, entre las 8:00 h y las 14:00h. Las ratas pesaban entre 250 y 350g al momento del entrenamiento.

2. Aparatos

Los sujetos tuvieron sesiones de manipulación durante tres días consecutivos en un período de 3 a 5 minutos antes de ser entrenados en la tarea de EI. El entrenamiento y la prueba se realizaron en un aparato específicamente diseñado para estudiar el aprendizaje de EI de un solo ensayo. Consiste en una cámara compuesta por dos compartimentos de acrílico transparente de color rojo (30 x 30 x 30 cm cada uno), separados por una puerta tipo guillotina (manejada por el experimentador). El compartimento de seguridad estaba iluminado por un foco incandescente de 10 W localizado en el centro de su tapa, el piso está hecho con barras

de acero inoxidable de 6 mm de diámetro y separadas una de otra cada 9 mm. El compartimento de castigo no está iluminado y a la mitad de su piso hay una ranura de 1.5 cm que separa dos placas de acero inoxidable que forman las paredes laterales. Tales placas tienen forma de “V” y tienen 20 cm de separación en la parte superior y 8 cm en la parte inferior. Las placas del compartimento de castigo están conectadas a una unidad de corriente constante (*Grass Instruments Co.*, modelo CCU-1A, EEUU), la cual está conectada a un estimulador de pulsos cuadrados (*Grass Instruments Co.*, modelo S-48, EEUU). La duración de los estímulos, así como las latencias de entrada, escape y retención fueron medidas con ayuda de un equipo automatizado. Ambos compartimentos se limpiaron con alcohol al 10% antes y después de que se colocara a la rata. La cámara de condicionamiento se ubica en un cuarto sonoamortiguado (2.4 x 1.95 x 2.50 m) y oscuro, provisto de una fuente de ruido blanco de fondo.

3. Entrenamiento y prueba de retención

El día de entrenamiento las ratas se situaron en el compartimento de seguridad de la caja de condicionamiento; después de 10 s la puerta se deslizó para permitir el paso al compartimento de castigo. Una vez que las cuatro patas de la rata tocaron el piso del compartimento de castigo la puerta se cerró y se administró un choque eléctrico constante; después de 5 s la puerta se abrió nuevamente permitiéndole a la rata escapar al compartimento de seguridad, donde permaneció por 30 s antes de regresarla a su caja habitación. Los choques eléctricos fueron administrados en forma de un tren de pulsos cuadrados de corriente de 50 ms de duración, una frecuencia de 10 Hz y una duración de tren de 10 s, con una intensidad de 1.0 o 3.0 mA; estas intensidades corresponden, respectivamente, a un nivel de entrenamiento moderado o intenso en esta tarea, siendo la intensidad de 3.0 mA la intensidad con la cual los sujetos presentan mayor resistencia a la extinción comparada con los sujetos entrenados con la intensidad de 1.0 mA (Garín-Aguilar et al., 2012; Bello-Medina et al., 2016). Se registró la latencia de entrada (tiempo que tarda la rata en pasar del compartimento iluminado al de castigo) y la latencia de escape (tiempo que la rata tarda en salir del compartimento de castigo). La prueba de retención (memoria de largo plazo) se realizó 24 horas después del entrenamiento y consistió en el mismo procedimiento exceptuando la administración del choque eléctrico; se registró la latencia de retención (tiempo que la rata permanece en el compartimento de seguridad antes de cruzar al compartimento de castigo).

La prueba se terminó una vez que el sujeto entró al compartimento de castigo o habiendo transcurridos 600 s.

4. Análisis histológico

4.1. Extracción de cerebros y criosección

Para el análisis histológico, se entrenó a grupos de ratas tal como se acaba de describir y 60 minutos después fueron sometidas a un procedimiento de eutanasia; debido al tiempo en el que se realizó la eutanasia, en estos grupos solo se consideraron las latencias de entrada y escape para el análisis conductual. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se congelaron en 2-metilbutano inmerso en una suspensión de hielo seco y etanol al 96%. Después de su congelamiento, los cerebros fueron almacenados a una temperatura de -70°C hasta el procedimiento de criosección.

Se utilizó una matriz de acero inoxidable en la que se colocaron los cerebros congelados para hacer cortes coronales que incluyen todo el estriado. Se obtuvieron secciones de tejido siguiendo un eje antero-posterior (Bregma, desde 0.24 hasta 1.20; Paxinos & Watson, 2007). Los tejidos obtenidos se colocaron en un molde de plástico para conformar los bloques. Cada bloque contenía 6 cerebros que fueron crioprotegidos con Tissue-Tek OCT. Para cada bloque se contempló tener al menos el cerebro de un sujeto de cada uno de los cinco grupos experimentales y que la posición del grupo al que perteneciera variara de bloque en bloque, evitando, así, un sesgo por la variabilidad de los procedimientos histológicos.

De cada uno de los cinco bloques resultantes se obtuvieron, utilizando un criostato, rebanadas de $20\ \mu\text{m}$. Los cortes se realizaron a una temperatura entre -18°C y -22°C . Las rebanadas se montaron en laminillas silanizadas y se almacenaron a -70°C previo a los procedimientos inmunohistoquímicos.

4.2. Inmunohistoquímica

Se tomaron tres laminillas de cada bloque, las cuales fueron fijadas con paraformaldehído al 2% (pH 7.4) por 8 minutos, seguido de lavados con TBS (pH 7.0) y TBST (pH 7.0). Se hizo un bloqueo con un kit de amplificación de señales de tiramida (TSA) antes de incubar los tejidos con el anticuerpo de conejo PKC fosforilada (1:400) (pan) ($\beta\text{II Ser660}$;

Cell Signaling) toda la noche a 4°C. Después de esto, los tejidos se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno (3.3%) disuelto en metanol, por 20 min.

Para detectar el anticuerpo primario, se utilizó un anti-rabbit (1:400) seguido de la amplificación con el sistema avidina-biotina (Vector) por 45 min. La inmunotinción se visualizó usando fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (1:100), y se hizo una contratinción con DAPI (1:2000) para detectar núcleos celulares. Por último, se montaron los cubreobjetos utilizando Vectashield (Vector).

4.3. Captura y análisis de imágenes

Se obtuvieron imágenes que cubrieran los 20 µm de grosor de los tejidos de cada cerebro con un microscopio semi-confocal Apotome (Carl Zeiss Imager Z1) con cámara AxioCamMR3. Los parámetros de imagen (brillo, contraste y saturación) se ajustaron de acuerdo con los valores observados en el sujeto del grupo bioterio de cada laminilla para hacer comparaciones con el resto de los tejidos. Para la captura de imágenes en profundidad (Z stacks), se utilizó un lente apocromático con objetivo 40 x y con filtros ajustados para la detección de FITC y DAPI. En cada cerebro se capturaron 6 imágenes por cada hemisferio; tres correspondientes al estriado dorsal y tres al estriado ventral, siguiendo una estrategia similar a la de Alonso-Lorenzo (2018) (Véase Figura 5).

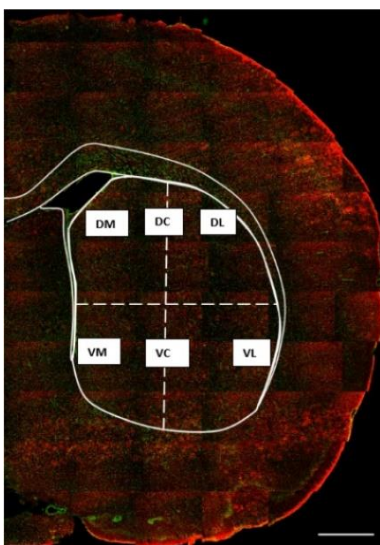


Figura 5. Regiones del estriado seleccionadas para la captura de imágenes. Fotografía en mosaico del estriado en donde se muestran las regiones seleccionadas para el análisis inmunohistoquímico. Las líneas punteadas delimitan las regiones dorsales-ventrales y mediales-laterales, tomando como límites referenciales el cuerpo calloso y los ventrículos laterales. DM: Estriado Dorsomedial; DC: Estriado Dorsocentral; DL: Estriado Dorsolateral; VM: Estriado Ventromedial; VC: Estriado Ventrocentral; VL: Estriado Ventrolateral. Barra de escala 1000 µm. Modificado de Alonso-Lorenzo (2018).

El análisis de imágenes se realizó con el Software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018) de libre uso. Se utilizaron tres medidas para el análisis de los niveles de pPKC: área de señal, densidad óptica relativa y densidad integrada. El área de señal funciona como un indicador de los niveles relativos de pPKC en un espacio bidimensional, mientras que las medidas de densidad son un indicador de la intensidad de la señal. Para el análisis del área de señal se tomó como constante al área total de las fotografías ($95640.262 \mu\text{m}^2$), de la cual el programa determinó el área ocupada por la señal de pPKC de acuerdo con los parámetros indicados por el experimentador. Para los análisis de densidad se consideraron los valores de los píxeles que conforman la imagen en una escala de grises. En la densidad óptica relativa se promediaron los valores de los píxeles de la imagen; en la densidad integrada se sumaron los valores de los píxeles. En ambos casos los valores reportados son en unidades arbitrarias, ya que son valores pre-establecidos para la intensidad del píxel en una imagen digitalizada.

5. Análisis estadístico

Se utilizó estadística no paramétrica para analizar los resultados conductuales dado que en la prueba de retención la medición tiene un tope de 600 segundos. Con la prueba Kruskal-Wallis se analizaron las latencias de entrada, escape y retención de forma independiente. La prueba U de Mann-Whitney se aplicó para hacer comparaciones entre pares de grupos.

Para comparar los niveles de PKC fosforilada en la S660 también se ha utilizado la prueba Kruskal-Wallis, debido a que los datos no cumplieron con el criterio de normalidad para la utilización de estadística paramétrica. Este estadístico se utilizó para hacer las comparaciones independientes entre hemisferios (izquierdo/derecho), regiones (dorsal/ventral) y tratamientos (Bio, Sch, 0.0 mA, 1.0 mA y 3.0 mA), así como para hacer las comparaciones intragrupal de regiones particulares: Estriado dorsomedial (EDM), Estriado dorsocentral (EDC), Estriado dorsolateral (EDL), Estriado ventromedial (EVM), Estriado ventrocentral (EVC) y Estriado ventrolateral (EVL).

6. Diseño experimental

Para los datos conductuales se utilizaron tres grupos con 8 ratas cada uno. Al primer grupo (0.0 mA) se le entrenó en la tarea de EI sin que se le administrara una descarga eléctrica. A los sujetos del segundo grupo (1.0 mA) se les entrenó con una descarga de 1.0 mA (descarga

moderada), mientras que el tercer grupo (3.0 mA) fue entrenado con una descarga de 3.0 mA (descarga intensa). Las latencias de retención de estos grupos se consideran como referencia conductual de la memoria de largo plazo ya que este dato no se obtuvo en los grupos en los que se realizó el análisis inmunohistoquímico.

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron cinco grupos con cinco ratas cada uno. De igual manera que para los datos conductuales, se tuvieron grupos entrenados sin descarga eléctrica (0.0 mA), con descarga moderada (1.0 mA) y con descarga intensa (3.0 mA). A los sujetos de un cuarto grupo (sólo choque, SCh) se les colocó directamente dentro del compartimento oscuro y se les administró la descarga eléctrica intensa (3.0 mA) durante 5 segundos + la media de latencia de escape obtenida en el grupo con entrenamiento de 3.0 mA. Se llevó a punto final humanitario a estos sujetos 60 minutos después de haber estado en la caja de EI. El quinto grupo (Bio) se mantuvo en condiciones de bioterio sin ningún tipo de manipulación hasta el momento de su sacrificio.

Los sacrificios de los sujetos para el análisis conductual y el análisis inmunohistoquímico se realizaron en diferentes días para evitar sesgos relacionados con variables fisiológicas, tal como el aumento en la liberación circádica de glucocorticoides, derivados de una sesión prolongada.

VII. RESULTADOS

1. Conducta

Los datos conductuales muestran que las latencias de entrada intergrupales no difieren, de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis ($H_{(2)} = 1.09$; $p = 0.58$) (Figura 6A). Respecto a las latencias de escape, se muestran diferencias estadísticamente significativas ($H_{(2)} = 15.80$; $p = 0.0004$). Para determinar entre qué grupos se presentan las diferencias se aplicó la prueba estadística U de Mann-Whitney; se observa que hay diferencias entre los grupos con entrenamiento de 0.0 mA y 1.0 mA ($p = 0.0008$) y entre los grupos 0.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.0009$), no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los grupos 1.0 y 3.0 mA ($p = 0.1492$) (Figura 6B). Las latencias de retención también difieren significativamente ($H_{(2)} = 17.9$; $p = 0.0001$). La prueba U Mann-Whitney demuestra que hay diferencias entre los grupos 0.0 mA y 1.0 mA ($p = 0.0008$) y entre los grupos 0.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.0006$), no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.2697$) (Figura 6C).

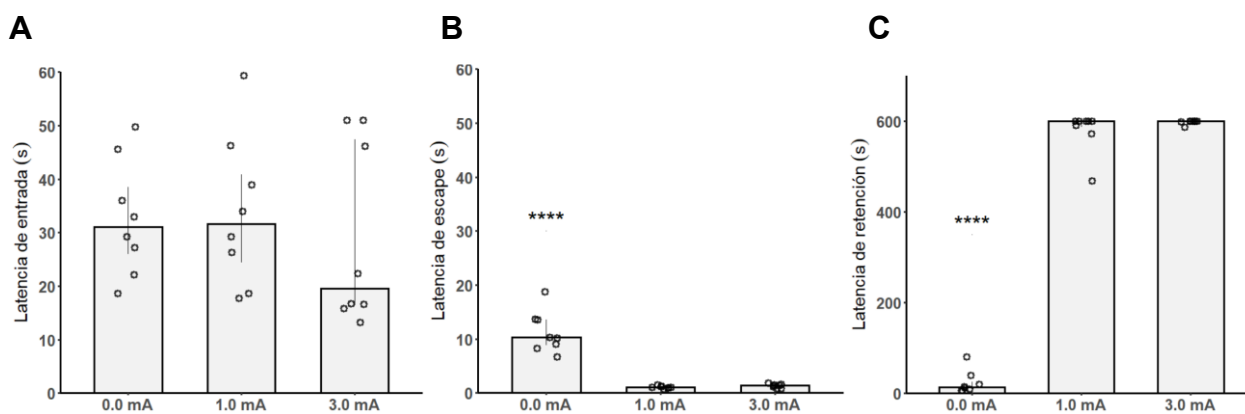


Figura 6. Resultados conductuales de la tarea de evitación inhibitoria. **A)** Latencias de entrada en segundos para cada uno de los grupos. **B)** Latencias de escape en segundos para cada uno de los grupos. **C)** Latencias de retención en segundos para cada uno de los grupos. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. ****, $p = 0.0001$ vs. los grupos 1.0 mA y 3.0 mA.

Los datos conductuales de los sujetos que se utilizaron para realizar el análisis inmunohistoquímico muestran que no hay diferencias intergrupales en las latencias de entrada ($H_{(2)} = 1.68$; $p=0.4$) (Figura 7A), pero sí en las latencias de escape ($H_{(2)} = 10.3$; $p=0.006$) (Figura 7B). La comparación de las latencias de escape entre el grupo 0.0 mA y 1.0 mA muestra diferencias significativas ($p=0.008$), igual que entre los grupos 0.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.01$), no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los grupos 1.0 mA y 3.0 mA ($p = 0.2873$) (Figura 7B).

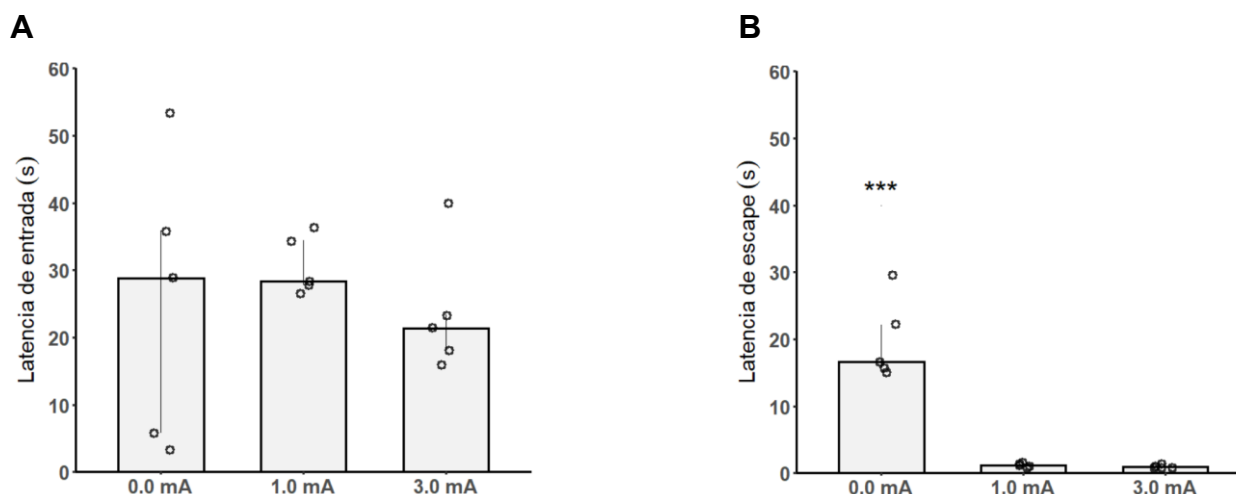


Figura 7. Resultados conductuales de la tarea de evitación inhibitoria de los grupos utilizados para el análisis inmunohistoquímico. **A)** Latencias de entrada en segundos para cada uno de los grupos. **B)** Latencias de escape en segundos para cada uno de los grupos. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. ***, $p = 0.006$ vs los grupos 1.0 mA y 3.0 mA.

La ausencia de diferencias significativas intergrupales en las latencias de entrada es un indicativo de que los sujetos de cada condición son equiparables en términos sensoriomotores, por lo que los resultados del experimento no pueden ser atribuidos a estas variables. Las diferencias encontradas en las latencias de escape entre el grupo entrenado sin descarga eléctrica (0.0 mA) y los grupos entrenados con una descarga moderada (1.0 mA) o intensa (3.0 mA), se explican por la naturaleza aversiva del estímulo utilizado; las bajas latencias de escape de los grupos que recibieron la descarga eléctrica fueron motivadas por ese evento aversivo, mientras que la ausencia de este no induce la respuesta de evitación típica que se observa tras su administración. Las latencias de retención altas encontradas en los grupos entrenados con descarga eléctrica indican que se estableció el aprendizaje de EI, lo que apoya nuestra primera hipótesis de trabajo. El hecho de que no existan diferencias en las latencias de retención entre los sujetos entrenados con 1.0 y 3.0 mA no descarta la posibilidad de que haya diferencias a nivel molecular. Por otro lado, las latencias de entrada y escape de los sujetos utilizados para el análisis inmunohistoquímico fueron semejantes a las observadas en los sujetos utilizados para el análisis conductual, lo que funciona como indicador indirecto del aprendizaje de la tarea en estos sujetos.

2. Inmunohistoquímica

En la figura 8 se muestran ejemplos de las imágenes de inmunohistoquímica con las que se hicieron las cuantificaciones de la pPKC en la S660. También se obtuvieron fotografías en mosaico de cerebros control en los que la técnica de inmunohistoquímica se realizó en una condición sin la adición del anticuerpo primario y en otra sin el anticuerpo secundario para determinar si el fluoróforo no daba señal inespecífica. Como se muestra en la Figura 9, el fluoróforo no es visible bajo estas condiciones.

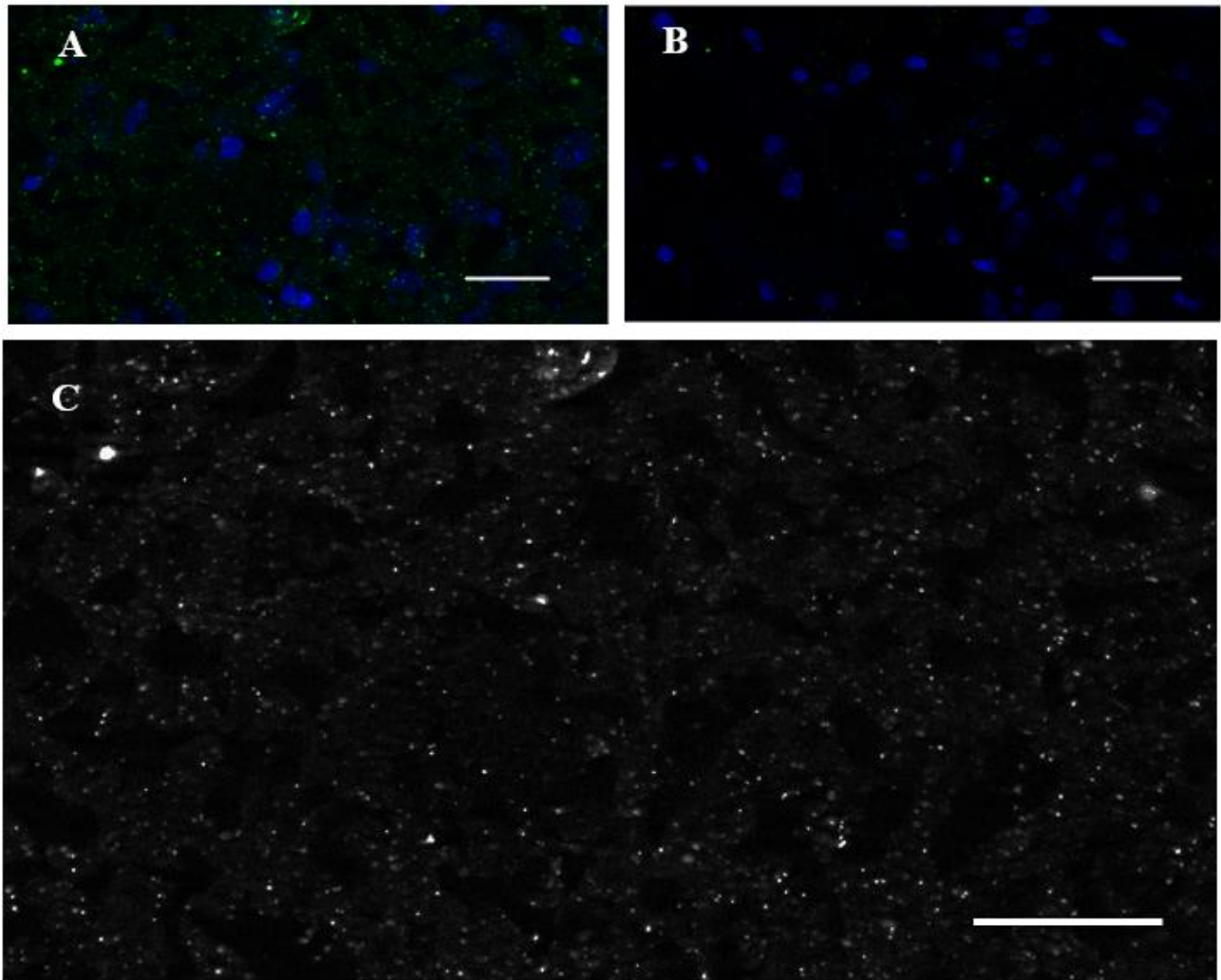


Figura 8. Imágenes representativas de la visualización de la señal de pPKC y núcleos celulares. A) y B) Fotografías con filtros ajustados para la detección de los fluoróforos FITC (verde) y DAPI (azul), que indican la presencia de pPKC en la S660 y núcleos celulares, respectivamente. **C)** Misma imagen en A sin el filtro para la visualización de DAPI y convertida a escala de grises. Barra de escala 50 μm .

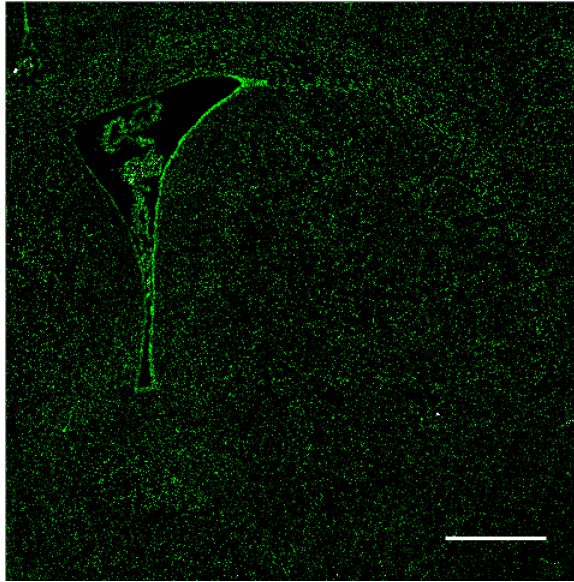
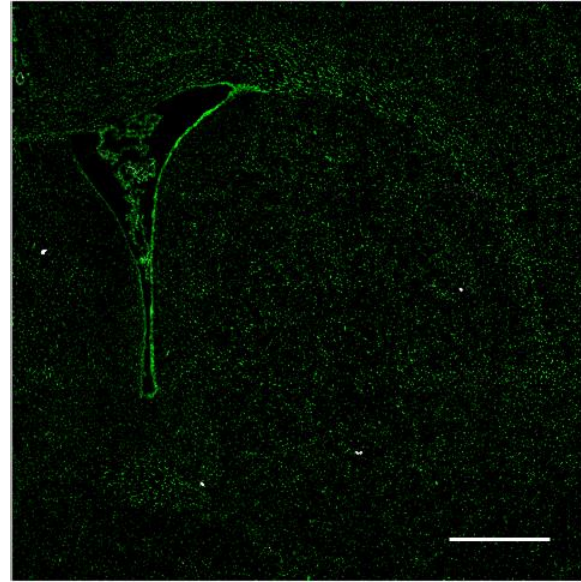
A**B**

Figura 9. Fotografías en mosaico de rebanadas control a las que no se les añadió el anticuerpo primario (izquierda) o el anticuerpo secundario (derecha) durante la inmunotinción. Barra de escala 500 μ m.

2.1. Niveles de la pPKC en el estriado completo

Considerando los análisis de la pPKC en la totalidad del estriado, los resultados no arrojaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las tres medidas utilizadas al realizarse comparaciones entre tratamientos. En el análisis por área de señal, se obtuvo una $p = 0.9604$ ($H_{(4)} = 0.624$) (Figura 10A). Del mismo modo, no se observaron diferencias en las medidas de densidad óptica relativa ($H_{(4)} = 1.489$; $p = 0.8286$) (Figura 10B) o integrada ($H_{(4)} = 1.476$; $p = 0.8309$) (Figura 10 C).

Respecto al análisis por hemisferios, el área de señal del hemisferio izquierdo no es diferente en ninguna de las condiciones ($H_{(4)} = 1.145$; $p = 0.8871$), caso similar a lo observado en el hemisferio derecho ($H_{(4)} = 1.908$; $p = 0.7527$) (Figura 10D). En ninguno de los grupos se observaron diferencias al realizar comparaciones interhemisféricas con la prueba U de Mann Whitney ($p > 0.05$). El análisis de densidad óptica relativa no indicó diferencias intergrupales al comparar la pPKC del hemisferio izquierdo ($H_{(4)} = 1.196$; $p = 0.8788$) o del hemisferio derecho ($H_{(4)} = 2.48$; $p = 0.6482$) (Figura 10E). El análisis interhemisférico tampoco arrojó diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p > 0.05$). La densidad integrada de la pPKC del hemisferio izquierdo no es diferente en ninguna de las condiciones ($H_{(4)} = 1.196$; $p = 0.8788$), lo mismo que para el hemisferio derecho ($H_{(4)} = 2.48$; $p = 0.6482$) (Figura 10F). De manera semejante a las otras mediciones, las comparaciones hemisferio izquierdo vs hemisferio

derecho no demostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones ($p > 0.05$).

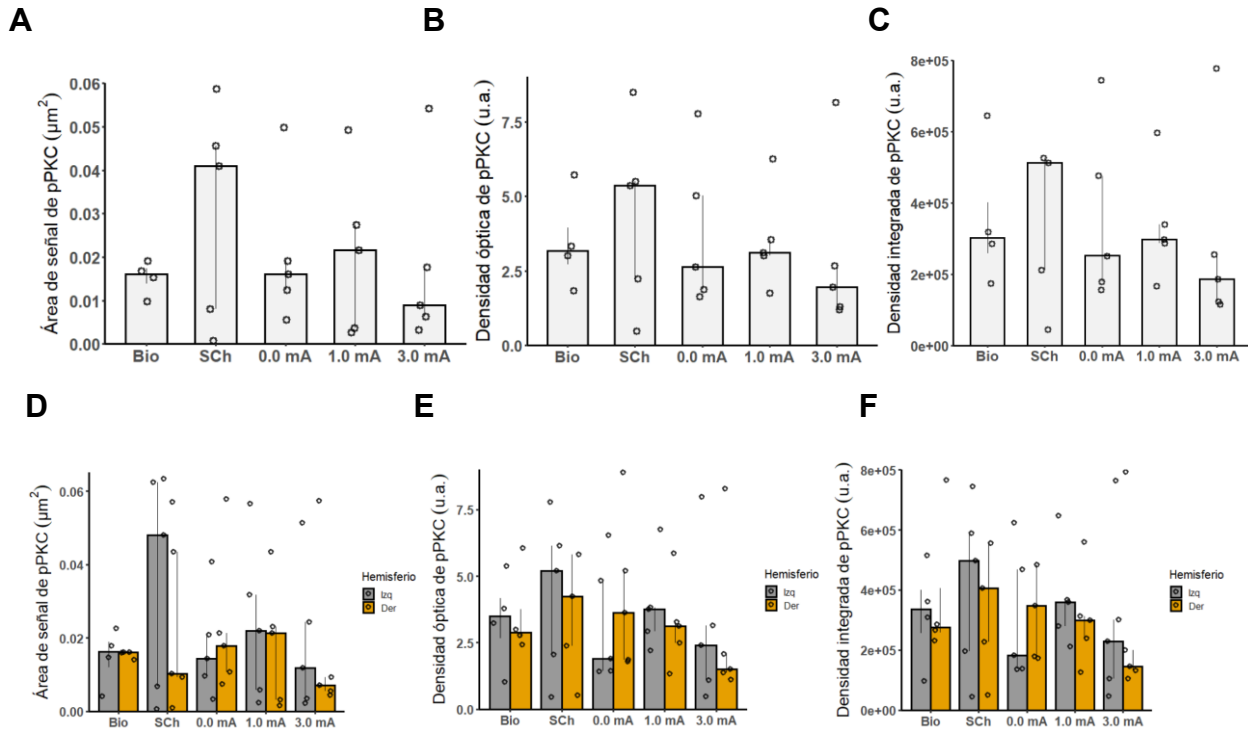


Figura 10. Mediciones de la pPKC en la S660 del estradió completo. A) Área de señal de la pPKC en μm^2 . **B)** Densidad óptica relativa de la pPKC en unidades arbitrarias (u.a.). **C)** Densidad integrada de la pPKC en unidades arbitrarias (u.a.). **D)** Área de señal de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). **E)** Densidad óptica relativa de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). **F)** Densidad integrada de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, $n = 5$ por grupo.

2.2. Niveles de la pPKC en la región dorsal del estriado

Los análisis de la pPKC en las regiones dorsales del estriado no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el área de señal ($H_{(4)} = 0.464$; $p = 0.9769$) (Figura 11A), la densidad óptica relativa ($H_{(4)} = 1.396$; $p = 0.8449$) (Figura 11B) o la densidad integrada ($H_{(4)} = 1.425$; $p = 0.8398$) (Figura 11C) al realizarse comparaciones intergrupales.

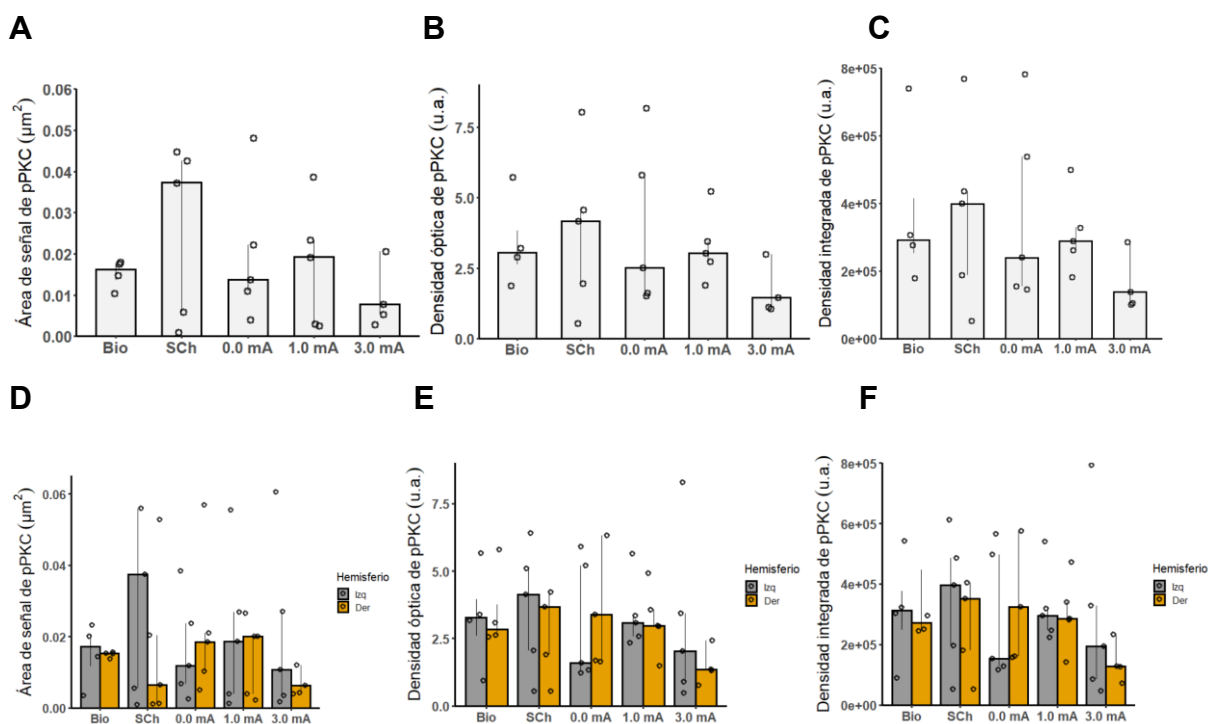


Figura 11. Mediciones de la pPKC en la S660 del estriado dorsal. A) Área de señal de la pPKC en μm^2 . **B)** Densidad óptica relativa de la pPKC en unidades arbitrarias (u.a.). **C)** Densidad integrada de la pPKC en unidades arbitrarias (u.a.). **D)** Área de señal de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). **E)** Densidad óptica relativa de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). **F)** Densidad integrada de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, $n = 5$ por grupo.

El análisis por hemisferios indica que no existen diferencias entre grupos en el área de señal de pPKC del hemisferio izquierdo ($H_{(4)} = 0.684$; $p = 0.9533$) o del hemisferio derecho ($H_{(4)} = 1.46$; $p = 0.8337$) (Figura 11D). El análisis interhemisférico tampoco mostró diferencias en ninguna de las condiciones ($p > 0.05$). Las medidas de densidad óptica relativa no reflejaron diferencias en el hemisferio izquierdo ($H_{(4)} = 0.785$; $p = 0.9404$) o derecho ($H_{(4)} = 2.489$; $p = 0.6466$) (Figura 11E), ni tampoco en las comparaciones interhemisféricas en ninguno de los grupos ($p > 0.05$). En cuanto a la densidad integrada, los resultados son similares a las otras mediciones; no se encontraron diferencias en el hemisferio izquierdo ($H_{(4)} = 0.785$; $p = 0.9404$), en el derecho ($H_{(4)} = 2.464$; $p = 0.6511$) (Figura 11F) o en las comparaciones entre hemisferios en ninguna condición ($p > 0.05$).

2.3. Niveles de la pPKC en la región ventral del estriado

Los niveles de pPKC del estriado ventral no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de área de señal ($H_{(4)} = 1.888$; $p = 0.7563$) (Figura 12A), la densidad óptica relativa ($H_{(4)} = 2.24$; $p = 0.6917$) (Figura 12B) o la densidad integrada ($H_{(4)} = 2.24$; $p = 0.6917$) (Figura 12C) al realizarse las comparaciones entre tratamientos.

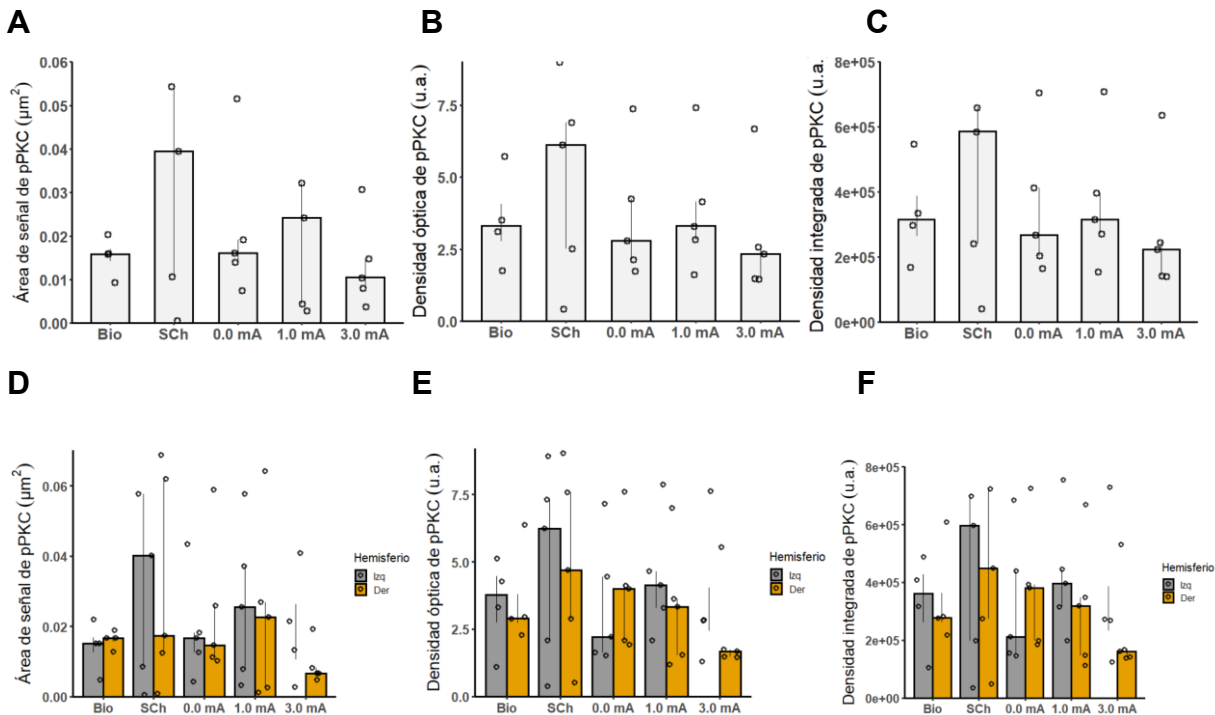


Figura 12. Mediciones de la pPKC en la S660 del estriado ventral. A) Área de señal de la pPKC en μm^2 . **B)** Densidad óptica relativa de la pPKC en unidades arbitrarias (u.a.). **C)** Densidad integrada de la pPKC en unidades arbitrarias (u.a.). **D)** Área de señal de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). **E)** Densidad óptica relativa de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). **F)** Densidad integrada de los diferentes tratamientos en hemisferio izquierdo (barras grises) y hemisferio derecho (barras anaranjadas). Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, $n = 5$ por grupo.

No se mostraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de área de señal al compararse los niveles de pPKC en el hemisferio izquierdo ($H_{(4)} = 1.004$; $p = 0.9092$), en el derecho ($H_{(4)} = 2.868$; $p = 0.5802$) (Figura 12D), o en la consideración interhemisférica de cada grupo ($p > 0.05$). El análisis de la densidad óptica relativa no mostró diferencias en el hemisferio izquierdo ($H_{(4)} = 1.1674$; $p = 0.8834$), en el derecho ($H_{(4)} = 3.625$; $p = 0.4591$) (Figura 12E), o en las comparaciones interhemisféricas de cada condición ($p > 0.05$). La densidad integrada

mostró resultados semejantes; no se observaron diferencias en el hemisferio izquierdo ($H_{(4)} = 1.1674$; $p = 0.8834$), en el hemisferio derecho ($H_{(4)} = 3.625$; $p = 0.4591$) (Figura 12F), o en las comparaciones interhemisféricas de cada condición ($p > 0.05$).

2.4. Niveles de la pPKC en regiones particulares del estriado

Se hicieron comparaciones intergrupales de los niveles de pPKC en regiones particulares del estriado (dorsomedial, dorsocentral, dorsolateral, ventromedial, ventrocentral y ventrolateral) para determinar si la falta de diferencias en las regiones dorsales y ventrales se debía a una posible sumación de los efectos de la dinámica de fosforilación en regiones particulares.

El análisis de área de señal no mostró diferencias estadísticamente significativas en la región dorsomedial ($H_{(4)} = 0.192$; $p = 0.9957$), dorsocentral ($H_{(4)} = 0.865$; $p = 0.9295$) o dorsolateral ($H_{(4)} = 1.1$; $p = 0.8943$) del estriado (Figura 13). De manera semejante, no se observaron diferencias en las regiones ventromediales ($H_{(4)} = 2.289$; $p = 0.6828$), ventrocentrales ($H_{(4)} = 1.376$, $p = 0.8484$) o ventrolaterales ($H_{(4)} = 1.593$; $p = 0.81$) (Figura 13), por lo que la falta de efectos en el análisis de área de señal de las regiones dorsales y ventrales no se debe al oscurecimiento por la sumación de niveles de fosforilación en las regiones particulares.

El análisis de la densidad óptica relativa tampoco mostró diferencias entre tratamientos al hacer las comparaciones en el estriado dorsomedial ($H_{(4)} = 0.617$; $p = 0.9612$), dorsocentral ($H_{(4)} = 1.348$; $p = 0.8532$) o dorsolateral ($H_{(4)} = 1.897$; $p = 0.7547$) (Figura 14). De igual manera, no se observaron diferencias en el estriado ventromedial ($H_{(4)} = 3.152$; $p = 0.5327$), ventrocentral ($H_{(4)} = 0.824$; $p = 0.9352$) o ventrolateral ($H_{(4)} = 1.2$; $p = 0.8781$) (Figura 14).

De la misma manera que con las anteriores medidas, en el análisis de la densidad integrada no se observaron diferencias en los niveles de pPKC en el estriado dorsomedial ($H_{(4)} = 0.761$; $p = 0.9436$), dorsocentral ($H_{(4)} = 1.348$; $p = 0.8532$) o dorsolateral ($H_{(4)} = 1.897$; $p = 0.7547$), lo mismo que para las comparaciones en el estriado ventromedial ($H_{(4)} = 3.152$; $p = 0.5327$), ventrocentral ($H_{(4)} = 0.824$; $p = 0.9352$) o ventrolateral ($H_{(4)} = 1.192$; $p = 0.8794$) (Figura 15). Estos resultados permiten concluir que no hay un efecto visible de los tratamientos sobre los niveles de la pPKC en la S660 con las medidas utilizadas.

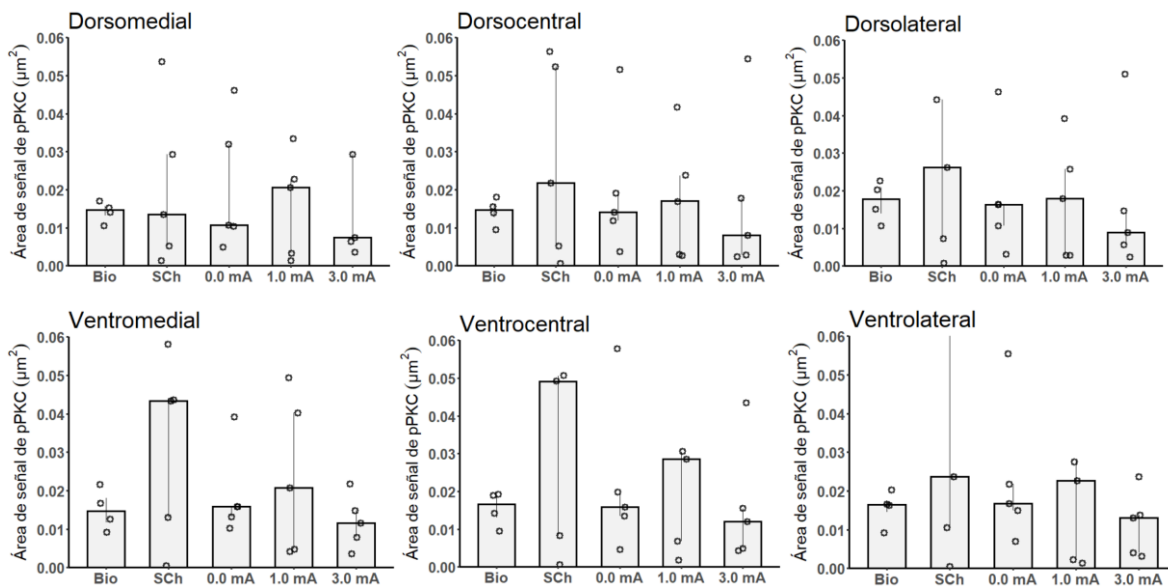


Figura 13. Niveles de pPKC en regiones particulares del estriado medidos con análisis de área de señal. La región se indica en la parte superior izquierda de cada gráfica. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, n = 5 por grupo.

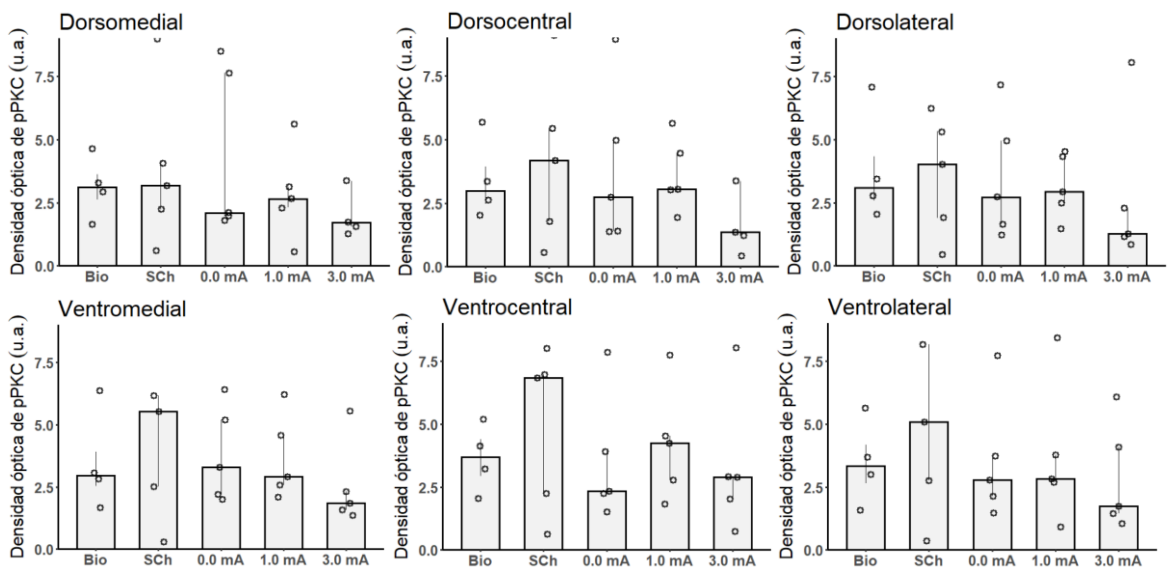


Figura 14. Niveles de pPKC en regiones particulares del estriado medidos con densidad óptica relativa. La región se indica en la parte superior izquierda de cada gráfica. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, n = 5 por grupo.

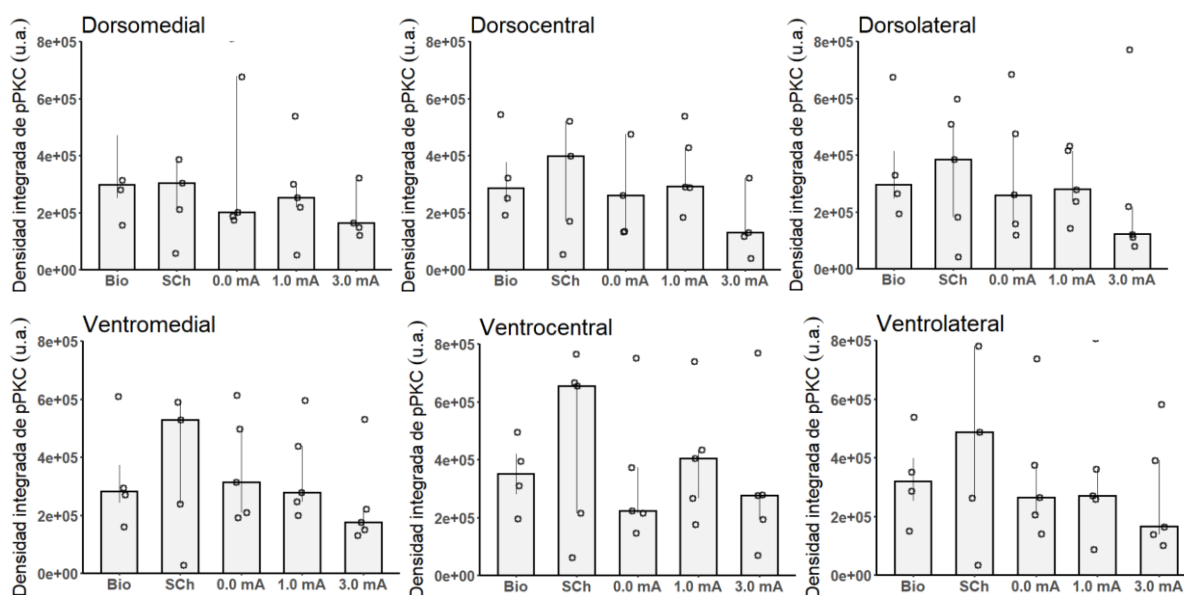


Figura 15. Niveles de pPKC en regiones particulares del estriado medidos con densidad óptica integrada. La región se indica en la parte superior izquierda de cada gráfica. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, $n = 5$ por grupo.

2.5. Comparaciones intragrupalas de los niveles de la pPKC en regiones particulares del estriado

Las comparaciones previas no descartan la posibilidad de que existan diferencias en los niveles de pPKC entre una región y otra dentro del mismo grupo, lo que reflejaría dinámicas de fosforilación específicas para las condiciones. Con el fin de determinar lo anterior, se hicieron comparaciones intragrupalas de los niveles de la pPKC en las diferentes regiones del estriado.

El análisis de área de señal no mostró diferencias estadísticamente significativas en el grupo bioterio ($H_{(5)} = 1.42$; $p = 0.9221$), solo choque ($H_{(5)} = 0.58194$; $p = 0.9888$), 0.0 mA ($H_{(5)} = 0.82968$; $p = 0.9751$), 1.0 mA ($H_{(5)} = 1.2839$; $p = 0.9366$), o en el de 3.0 mA ($H_{(5)} = 0.41677$; $p = 0.9949$) (Figura 16). El análisis de la densidad óptica relativa arrojó resultados similares; no se observaron diferencias en el grupo bioterio ($H_{(5)} = 0.48$; $p = 0.9928$), solo choque ($H_{(5)} = 1.1703$; $p = 0.9477$), 0.0 mA ($H_{(5)} = 0.50452$; $p = 0.992$), 1.0 mA ($H_{(5)} = 1.4077$; $p = 0.9235$), o 3.0 mA ($H_{(5)} = 1.2529$; $p = 0.9397$) (Figura 17). Del mismo modo, la densidad integrada no mostró ser diferente en ninguna de las condiciones: grupo bioterio ($H_{(5)} = 0.33$; $p = 0.997$), solo choque ($H_{(5)} = 1.1703$; $p = 0.9477$), 0.0 mA ($H_{(5)} = 0.44258$; $p = 0.9941$), 1.0 mA ($H_{(5)} = 1.4077$; $p = 0.9235$), o 3.0 mA ($H_{(5)} = 1.2529$; $p = 0.9397$) (Figura 18). En conjunto, los resultados

indican que no hay cambios en los niveles de pPKC en la S660 asociados a ninguna de las condiciones del experimento.

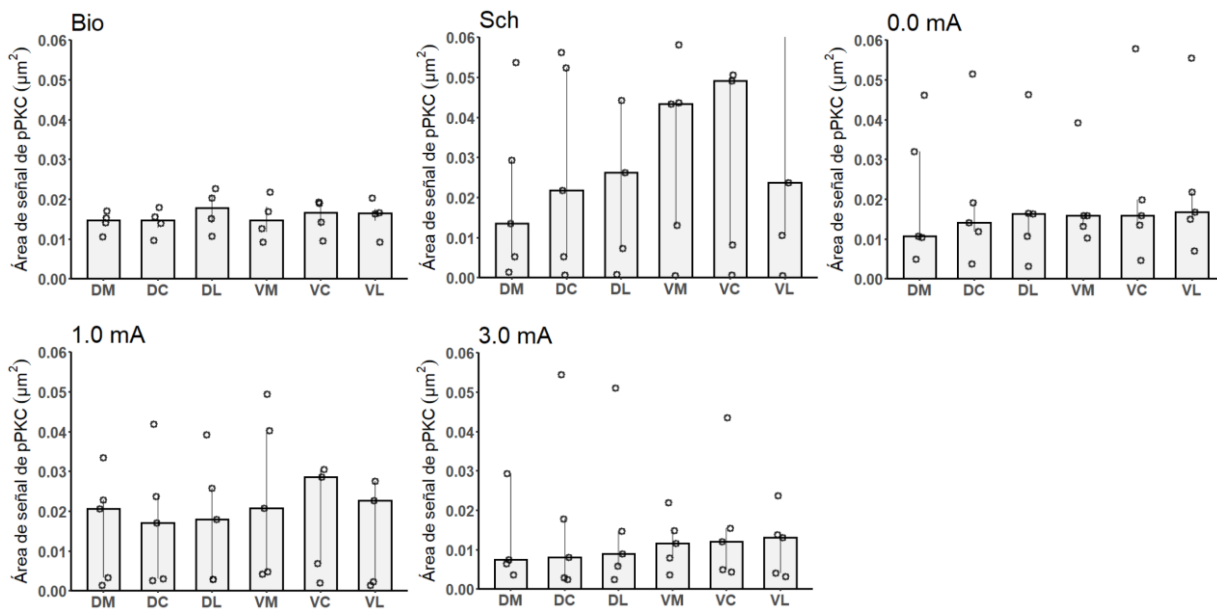


Figura 16. Comparaciones intragrupal de regiones particulares del estriado medidas con análisis de área de señal. El grupo se indica en la parte superior izquierda de cada gráfica. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, n = 5 por grupo.

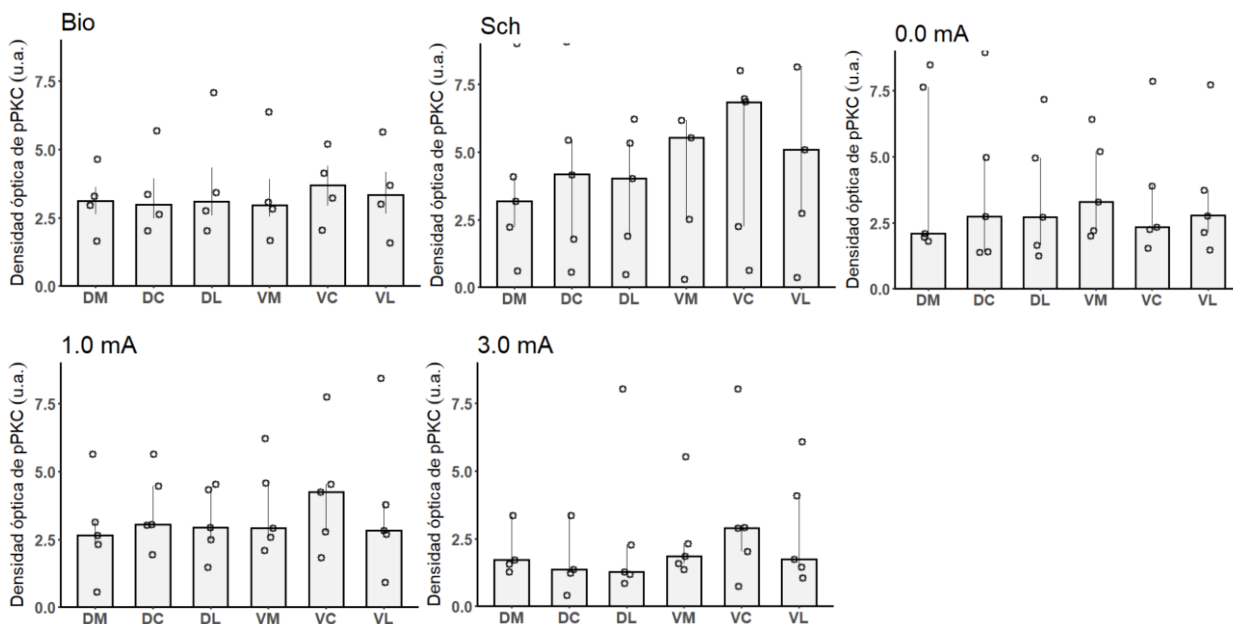


Figura 17. Comparaciones intragrupal de regiones particulares del estriado medidas con densidad óptica relativa. El grupo se indica en la parte superior izquierda de cada gráfica. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, n = 5 por grupo.

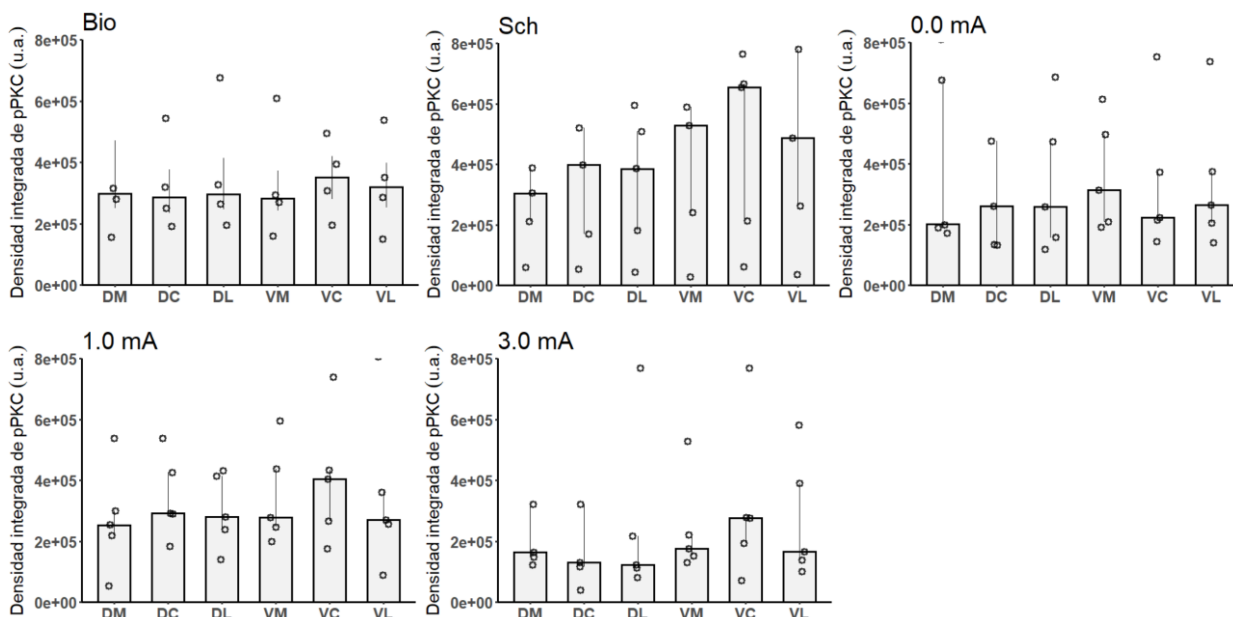


Figura 18. Comparaciones intragrupalas de regiones particulares del estriado medidas con densidad integrada. El grupo se indica en la parte superior izquierda de cada gráfica. Todas las medidas se muestran en medianas con rangos intercuartiles. Tamaño de la muestra, $n = 5$ por grupo.

Se han realizado las comparaciones con la prueba de Kruskal-Wallis para el análisis de área de señal, la densidad óptica relativa y la densidad integrada de la pPKC en la S660. Se han comparado los valores totales, por región (dorsal, ventral), hemisferio y regiones particulares (dorsomedial, dorsocentral, dorsolateral, ventromedial, ventrocentral, ventrolateral); en ninguna comparación se han observado diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior pudiera indicar que los niveles de la pPKC en el estriado no están relacionados con el entrenamiento en la tarea de EI, independientemente de la intensidad con la que se presente.

VIII. DISCUSIÓN

Las observaciones principales de este trabajo indican que las medidas de la PKC fosforilada en la S660, dadas por el análisis de área de señal, la densidad óptica relativa y la densidad integrada, no cambian en el estriado de ratas después de un entrenamiento en la tarea de EI, independientemente de la intensidad de este. Estos resultados sugieren que los niveles de pPKC en la S660 a los 60 minutos después del entrenamiento no están relacionados con la consolidación de esta tarea en ninguna de las regiones del estriado analizadas. Lo anterior no descarta la posibilidad de la participación de la PKC en el estriado tras el

entrenamiento en esta tarea ya que la estrategia utilizada no es informativa respecto al estado de activación de las proteínas detectadas (Freeley, Kelleher, & Long, 2011).

El marcaje inmunohistoquímico de la fosforilación en la S660 es una técnica ideal para la detección de la proteína si lo que se busca es identificar la presencia de diferentes isoformas relativamente estables, debido a la conservación de esta región en la mayoría de los miembros de la familia y a que el estado fosforilado en el motivo hidrofóbico las hace menos susceptibles a la degradación (Freeley et al., 2011). Sin embargo, una de sus desventajas es su poca sensibilidad para la discriminación entre los estados activos e inactivos de las proteínas marcadas. En el modelo de Keranen et al. (1995) acerca de la activación de la PKC, se resalta la relevancia de las fosforilaciones en regiones conservadas de sus dominios catalíticos para el incremento de su afinidad por segundos mensajeros y para posibilitar una respuesta enzimática competente; estas fosforilaciones se mantienen aún en el estado activo de la proteína, de hecho se ha reportado que las desfosforilaciones en estos sitios son necesarias para la inactivación enzimática (Hansra, García-Paramio, Prevostel, Whelan, Bornancin, & Parker, 1999), lo que indica que la identificación de regiones fosforiladas puede ser de proteínas conformacionalmente maduras pero inactivas, o de proteínas activadas por sus segundos mensajeros.

Hay evidencia que sugiere que la fosforilación en estos sitios se da poco después de la síntesis de las proteínas (Sonnenburg, Gao, & Newton, 2001); este es un modelo prevaleciente que considera a las fosforilaciones de la PKC como constitutivas; sin embargo, hay estudios en donde se ha reportado la existencia de formas no fosforiladas o hipofosforiladas que tras una determinada estimulación celular son inducidas a su estado fosforilado (Cheng, He, Tian, Dinauer, & Ye, 2007; Kilpatrick, Sun, Li, Vary, & Korchak, 2010; Osto et al., 2008; Wang, Yan, Sun, Liu, Go, McDaniel, & Paller, 2007; Zhou, Fariss, & Zelenka, 2003), contrario al modelo de la fosforilación constitutiva. En otros trabajos se ha hecho notar esta discusión sobre el cómo-cuándo-dónde de las fosforilaciones de la PKC, con énfasis en el problema '¿constitutivas o inducibles?' (Freeley et al., 2011). Debido a la carencia de estudios que consideren el análisis de la PKC en el estriado tras un entrenamiento en la tarea de EI y al desconocimiento del papel del sobrerreforzamiento sobre la inducción de fosforilaciones en regiones conservadas de la proteína, se consideró relevante como primer acercamiento la identificación de las proteínas fosforiladas en su motivo hidrofóbico, para determinar si desde este proceso autorregulatorio era posible observar cambios en función de los tratamientos. La falta de evidencia que apoye cambios en los niveles de la pPKC en la S660 bajo ninguna condición de entrenamiento se

puede deber a que los mecanismos de maduración de la proteína se dan de manera previa a la señalización neuronal desencadenada por el entrenamiento, lo que apoyaría el modelo de las fosforilaciones constitutivas.

Se hacen necesarias manipulaciones adicionales para entender la relevancia de la vía de la PKC en la consolidación de la memoria bajo diferentes intensidades de entrenamiento. En otras proteínas cinasas se han estudiado los niveles de los segundos mensajeros que activan a la proteína de interés; en el caso de la PKC, estudiar el DAG o el Ca^{2+} no es común debido a que estas moléculas actúan como segundos mensajeros de diferentes vías de señalización, por lo que no darían información específica sobre la vía de la PKC. Otras posibilidades son el análisis de la actividad de las enzimas a través de la medición de unión de radioligandos (Bernabeu, Izquierdo, Cammarota, Jerusalinsky, & Medina, 1995), el conteo de la incorporación de fosfatos en un fosfoceptor (Cammarota, Paratcha, de Stein, Bernabeu, Izquierdo, & Medina, 1997), la medición de los niveles de sustratos fosforilados específicos de la PKC (Cammarota et al., 1997), o el uso de activadores o inhibidores administrados en un tiempo cercano al entrenamiento (Furini, Myskiw, Schmidt, Marcondes, & Izquierdo, 2014; Izquierdo et al., 2000; Jerusalinsky, Quillfeldt, Walz, Da Silva, Medina, & Izquierdo, 1994).

El uso de estas estrategias no garantizaría que se observen cambios en la actividad de la PKC relacionados con la intensidad del entrenamiento, pues también existe la posibilidad de que su participación en el estriado sea mediar el proceso de consolidación a través de niveles basales de actividad, en cuyo caso su alteración tendría un efecto sobre los procesos de la memoria sin que ello implique una sobreactivación de la vía durante los mismos, como se ha visto para la PKA en otras estructuras cerebrales (Pereira, Ardenghi, Souza, Medina & Izquierdo, 2001). En el trabajo de Pereira et al. (2001) se reportó la actividad de la PKA en diferentes tiempos después del entrenamiento en la tarea de EI; en el hipocampo y en la corteza entorrinal se observaron picos de actividad a las 0 y a las 3 h después del entrenamiento, mientras que en la corteza parietal y en el cíngulo posterior no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos entre los sujetos entrenados y los sujetos control. Los autores resaltan el hecho de que estas cortezas son sensibles a la inhibición de la PKA en la retención de la información (Ardenghi et al., 1997; Souza et al., 2002), por lo que se sugiere que dichas cortezas solo requieren de niveles de actividad basal como mínimo requisito para que se dé la consolidación y que, en caso de alterar esos niveles se genera un efecto de deterioro sobre la memoria.

En un trabajo reciente de nuestro laboratorio, se observó que la inhibición farmacológica de la PKC en el estriado dorsomedial de ratas entrenadas en la tarea de EI impide la formación de la memoria de largo plazo tanto de sujetos con un entrenamiento moderado como intenso, sin que se vea afectada la memoria de corto plazo (Guillermo-Montiel, 2021). Estos resultados podrían indicar la participación de la PKC en el proceso de consolidación en una región previamente asociada con cambios estructurales (espinogénesis) relacionados con la intensidad del entrenamiento (Bello-Medina et al., 2016). Falta determinar, con manipulaciones que indiquen el estado de actividad de las proteínas, si estas alteraciones en los procesos mnémicos se deben a la inhibición de la actividad basal o a la de la actividad derivada de la estimulación asociada a la experiencia de aprendizaje. Existe evidencia que indica que en el estriado no hay cambios en la dinámica de unión de un análogo del DAG bajo ninguna condición de entrenamiento en la misma tarea (Bernabeu et al., 1995), lo que sugiere que la actividad basal tiene un papel permisivo en esta región para que se dé la consolidación de la memoria. Sin embargo, no se cuenta con la información suficiente para determinar si esto se refleja solo al considerar al estriado en su totalidad o si también se observa un patrón molecular semejante en sus regiones particulares.

Otras consideraciones adicionales que expliquen los resultados de este estudio es el tiempo en el que se realizaron los sacrificios y el tamaño de la muestra. Se decidió realizar los análisis de la PKC fosforilada a los 60 minutos después del entrenamiento debido a que es el tiempo en el que se ha reportado un incremento en la fosforilación de la proteína después de algún procedimiento de estimulación celular (Busquets-García et al., 2018; Sweatt et al., 1998). A pesar de ello, no se descarta la posibilidad de que en nuestras condiciones experimentales el incremento pueda darse en otro tiempo. Cammarota et al. (1997), han reportado un incremento en la actividad de la PKC en las membranas sinaptosomales del hipocampo a los 30 minutos después del entrenamiento en la tarea de EI, sin detectar cambios estadísticamente significativos a los 60 min. No pasa desapercibido que, en este caso, la estructura y método de análisis son distintos a los de nuestro estudio, aun así, permite resaltar la importancia del análisis a diferentes cortes temporales.

En futuros trabajos tendría que considerarse, además del tiempo y el tamaño de la muestra, tener grupos control de regiones en las que ya se conoce que existe un incremento en la actividad de la PKC por el entrenamiento en la tarea, con el fin de verificar que las manipulaciones se realizaron de manera apropiada. Otra consideración es el análisis de las proteínas no fosforiladas, como una medida del reclutamiento de estas por síntesis *de novo*.

También resultaría de especial interés entender la dinámica de actividad de los diferentes miembros de la familia de las PKC. Todo ello serviría como un marco de referencia sólido para tener una comprensión más amplia de los elementos moleculares involucrados en el proceso de consolidación de la tarea de EI. Como primer acercamiento a esta dinámica molecular, se puede concluir que la PKC fosforilada en la S660 a los 60 minutos después del entrenamiento en esta tarea no se relaciona con los cambios morfológicos reportados por Bello-Medina et al. (2016), o con los patrones de activación observados en el trabajo de González-Franco et al. (2017). Falta determinar la función que adquiere la actividad de la PKC para explicar lo observado por Guillermo-Montiel (2021) en el estriado dorsomedial.

IX. CONCLUSIONES

- El entrenamiento en la tarea de EI no induce cambios en los niveles de PKC fosforilada en la S660 a los 60 min después del entrenamiento.
- El sobrerreforzamiento no se explica por un incremento en los niveles de PKC fosforilada en la S660 a los 60 min después del entrenamiento.
- No existe una regionalización o lateralización en el estriado relacionada con los niveles de PKC fosforilada en la S660.

X. REFERENCIAS

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(2), 180-187.
- Agranoff, B. W., Davis, R. E., & Brink, J. J. (1965). Memory fixation in the goldfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(3), 788-793.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366-375.
- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 266-271.
- Alexander, G. E., DeLong, M. R., & Strick, P. L. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual Review of Neuroscience*, 9(1), 357-381.
- Alonso-Lorenzo, E. V. (2018). *Efecto del entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria sobre la fosforilación de CREB en el estriado de ratas* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM - Vista completa del registro
- Alvarez-Jaimes, L., Betancourt, E., Centeno-González, M., Feliciano-Rivera, M. Z., Rodríguez, D., de Ortíz, S. P., & Maldonado-Vlaar, C. S. (2004). Spatial learning in rats is impaired by microinfusions of protein kinase C- γ antisense oligodeoxynucleotide within the nucleus accumbens. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(2), 120-136.
- Ananthanarayanan, B., Stahelin, R. V., Digman, M. A., & Cho, W. (2003). Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46886-46894.
- André, V. M., Cepeda, C., Cummings, D. M., Jocoy, E. L., Fisher, Y. E., William Yang, X., & Levine, M. S. (2010). Dopamine modulation of excitatory currents in the striatum is dictated by the expression of D1 or D2 receptors and modified by endocannabinoids. *European Journal of Neuroscience*, 31(1), 14-28.
- Ardenghi, P., Barros, D., Izquierdo, L. A., Bevilaqua, L., Schröder, N., Quevedo, J., ... & Izquierdo, I. (1997). Late and prolonged post-training memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase A signalling pathway. *Behavioural Pharmacology*, 8(8), 745-751.
- Arencibia, J. M., Pastor-Flores, D., Bauer, A. F., Schulze, J. O., & Biondi, R. M. (2013). AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(7), 1302-1321.
- Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B., & Kandel, E. R. (2019). Molecular mechanisms of the memory trace. *Trends in Neurosciences*, 42(1), 14-22.

- Atallah, H. E., Lopez-Paniagua, D., Rudy, J. W., & O'Reilly, R. C. (2007). Separate neural substrates for skill learning and performance in the ventral and dorsal striatum. *Nature Neuroscience*, 10(1), 126-131.
- Bailey, C. H., Bartsch, D., & Kandel, E. R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13445-13452.
- Bank, B., DeWeer, A., Kuzirian, A. M., Rasmussen, H., & Alkon, D. L. (1988). Classical conditioning induces long-term translocation of protein kinase C in rabbit hippocampal CA1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(6), 1988-1992.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1966). Puromycin effect on successive phases of memory storage. *Science*, 151(3710), 594-595.
- Bello-Medina, P. C., Flores, G., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Alcalá, R. A. P. (2016). Mushroomspine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), E6516-E6525.
- Bernabeu, R., Izquierdo, I., Cammarota, M., Jerusalinsky, D., & Medina, J. H. (1995). Learning-specific, time-dependent increase in [3H] phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. *Brain Research*, 685(1-2), 163-168.
- Berridge, M. J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(6), 933-940.
- Bittova, L., Stahelin, R. V., & Cho, W. (2001). Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C- α activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4218-4226.
- Blomeley, C. P., & Bracci, E. (2009). Serotonin excites fast-spiking interneurons in the striatum. *European Journal of Neuroscience*, 29(8), 1604-1614.
- Blomeley, C., & Bracci, E. (2005). Excitatory effects of serotonin on rat striatal cholinergic interneurons. *The Journal of Physiology*, 569(3), 715-721.
- Bonini, J. S., Da Silva, W. C., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience*, 147(1), 37-45.
- Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Tschertter, A., ... & Pisani, A. (2007). Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT_{2C}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonin receptors: implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1840-1854.
- Busquets-García, A., Gomis-González, M., Salgado-Mendialdúa, V., Galera-López, L., Puighermanal, E., Martín-García, E., Maldonado, R., & Ozaita, A. (2018). Hippocampal protein kinase C signaling

- mediates the short-term memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology*, 43(5), 1021.
- Calabrese, B., & Halpain, S. (2005). Essential role for the PKC target MARCKS in maintaining dendritic spine morphology. *Neuron*, 48(1), 77-90.
- Calabresi, P., Fedele, E., Pisani, A., Fontana, G., Mercuri, N. B., Bernardi, G., & Raiteri, M. (1995). Transmitter release associated with long-term synaptic depression in rat corticostriatal slices. *European Journal of Neuroscience*, 7(9), 1889-1894.
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., & Bernardi, G. (1990). Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. II. An in vitro analysis. *Journal of Neurophysiology*, 63(4), 663-675.
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., Stefani, A., & Bernardi, G. (1990). Synaptic and intrinsic control of membrane excitability of neostriatal neurons. I. An in vivo analysis. *Journal of Neurophysiology*, 63(4), 651-662.
- Calabresi, P., Pisani, A., Centonze, D., & Bernardi, G. (1997). Synaptic plasticity and physiological interactions between dopamine and glutamate in the striatum. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(4), 519-523.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B., & Bernardi, G. (1994). Post-receptor mechanisms underlying striatal long-term depression. *Journal of Neuroscience*, 14(8), 4871-4881.
- Callender, J. A., & Newton, A. C. (2017). Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. *Neuronal Signaling*, 1(2).
- Cammarota, M., Paratcha, G., de Stein, M. L., Bernabeu, R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochemical Research*, 22(4), 499-505.
- Capper-Loup, C., & Kaelin-Lang, A. (2008). Lateralization of dynorphin gene expression in the rat striatum. *Neuroscience Letters*, 447(2-3), 106-108.
- Capper-Loup, C., Rebell, D., & Kaelin-Lang, A. (2009). Hemispheric lateralization of the corticostriatal glutamatergic system in the rat. *Journal of Neural Transmission*, 116(9), 1053-1057.
- Careaga, M. B. L., Girardi, C. E. N., & Suchecki, D. (2016). Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 71, 48-57.
- Castro, M. C., & Martini, H. A. (2014). Potencia estadística y cálculo del tamaño del efecto en G* Power: complementos a las pruebas de significación estadística y su aplicación en psicología. *Salud & Sociedad*, 5(2), 210-224.
- Cepeda, C., André, V. M., Yamazaki, I., Wu, N., Kleiman-Weiner, M., & Levine, M. S. (2008). Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *European Journal of Neuroscience*, 27(3), 671-682.

- Chavez, M. E., Salado-Castillo, R., Sanchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1995). Post-training injection of GABAergic antagonists into the striatum produces retrograde amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63(3), 296-300.
- Chen, S. J., Sweatt, J. D., & Klann, E. (1997). Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Research*, 749(2), 181-187.
- Chen, Y., Cantrell, A. R., Messing, R. O., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2005). Specific Modulation of Na⁺ Channels in Hippocampal Neurons by Protein Kinase C ϵ . *Journal of Neuroscience*, 25(2), 507- 513.
- Cheng, N., He, R., Tian, J., Dinauer, M. C., & Richard, D. Y. (2007). A critical role of protein kinase C δ activation loop phosphorylation in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced phosphorylation of p47phox and rapid activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *The Journal of Immunology*, 179(11), 7720-7728.
- Cobos-Zapian, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., del Guante, M. D., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202-206.
- Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2010). The C2 domains of classical and novel PKCs as versatile decoders of membrane signals. *Biofactors*, 36(1), 1-7.
- Cruz-Morales, S. E., Duran-Arevalo, M., Del Guante, M. A. D., Quirarte, G., & Prado-Alcala, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*, 57(3), 256-259.
- Cruz-Morales, S. E., Quirarte, G. L., del Guante, M. A. D., & Prado-Alcalá, R. A. (1993). Effects of GABA antagonists on inhibitory avoidance. *Life Sciences*, 53(16), 1325-1330.
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Gut, N. K., Valencia, M., Kondabolu, K., Kim, Y., ... & Mena-Segovia, J. (2020). Cholinergic midbrain afferents modulate striatal circuits and shape encoding of action strategies. *Nature Communications*, 11(1), 1-19.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*, 96(3), 518.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin*, 96(3), 518.
- DeLong, M. R., & Wichmann, T. (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of Neurology*, 64(1), 20-24.
- Desmedt, A., Marighetto, A., & Piazza, P. V. (2015). Abnormal fear memory as a model for posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, 78(5), 290-297.

- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(3), 310-314.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51-86.
- Duncan, C. P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 42(1), 32.
- Duncan, N., & Hunt, E. (1972). Reduction of ECS produced retrograde amnesia by post-trial introduction of strychnine. *Physiology & Behavior*, 9(3), 295-300.
- Duncan, N., & Hunt, E. (1972). Reduction of ECS produced retrograde amnesia by post-trial introduction of strychnine. *Physiology & Behavior*, 9(3), 295-300.
- Durán-Arévalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, 24(6), 725-727.
- English, D. F., Ibanez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsáki, G., Deisseroth, K., ... & Koos, T. (2012). GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 15(1), 123.
- Fallon, J. H., & Moore, R. Y. (1978). Catecholamine innervation of the basal forebrain IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *Journal of Comparative Neurology*, 180(3), 545-579.
- Ferry B, McGaugh JL. (2000). Role of amygdala norepinephrine in mediating stress hormone regulation of memory storage. *Acta Pharmacologica Sinica*, 21(6):481-493.
- Flexner, J. B., Flexner, L. B., & Stellar, E. (1963). Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science*, 141, 57-59.
- Flexner, J. B., Flexner, L. B., Stellar, E., de la Haba, G., & Roberts, R. B. (1962). Inhibition of protein synthesis in brain and learning and memory following puromycin. *Journal of Neurochemistry*, 595-605.
- Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., ... & Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, 88(6), 3010-3020.
- Freeley, M., Kelleher, D., & Long, A. (2011). Regulation of protein kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cellular Signalling*, 23(5), 753-762.
- Furini, C. R. G., Myskiw, J. C., Schmidt, B. E., Marcondes, L. A., & Izquierdo, I. (2014). D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behavioural Brain Research*, 271, 212-217.

- Galvez, R., Mesches, M. H., & McGaugh, J. L. (1996). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiology of Learning and Memory*.
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Medina, A. C., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., & Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 12.
- Gerfen, C. R., & Bolam, J. P. (2017). The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. En: *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*. Editado por H. Steiner & K. Y. Tseng, Academic Press, ISBN: 978-0-12-802206-1, pp. 3-32.
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 441-466.
- German, D. C., & Manaye, K. F. (1993). Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 331(3), 297-309.
- Giordano, M., & Prado-Alcalá, R. A. (1986). Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(4), 905-909.
- Gonzales, G., Przedworski, J., & Henning-Smith, C. (2016). Comparison of health and health risk factors between lesbian, gay, and bisexual adults and heterosexual adults in the United States: results from the National Health Interview Survey. *JAMA Internal Medicine*, 176(9), 1344-1351.
- González-Franco, D. A., Bello-Medina, P. C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2019). Effects of anisomycin infusions into the dorsal striatum on memory consolidation of intense training and neurotransmitter activity. *Brain Research Bulletin*, 150, 250-260.
- González-Franco, D. A., Ramírez-Amaya, V., Joseph-Bravo, P., Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 140, 17-26.
- Graybiel, A. M. (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 244-254.
- Groenewegen, H. J., Vermeulen-Van der Zee, E. T., Te Kortschot, A., & Witter, M. P. (1987). Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 23(1), 103-120.
- Grünbaum, L., & Müller, U. (1998). Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *Journal of Neuroscience*, 18(11), 4384-4392.
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J. H., Miniaci, M. C., Schwartz, J. H., ... & Kandel, E. R. (2002). Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*, 111(4), 483-493.

- Guillermo-Montiel, I. H. (2021). *Efecto del bloqueo de la actividad de la PKC en el estriado dorsomedial de ratas sobre la consolidación de un entrenamiento moderado o intenso de evitación inhibitoria* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM - Vista completa del registro
- Haber, S. N., Kunishio, K., Mizobuchi, M., & Lynd-Balta, E. (1995). The orbital and medial prefrontal circuit through the primate basal ganglia. *Journal of Neuroscience*, *15*(7), 4851-4867.
- Hansra, G., García-Paramio, P., Prevostel, C., Whelan, R. D., Bornancin, F., & Parker, P. J. (1999). Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. *Biochemical Journal*, *342*(2), 337-344.
- Hernandez, P. J., & Abel, T. (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(3), 293-311.
- Hernández-Echeagaray, E., Starling, A. J., Cepeda, C., & Levine, M. S. (2004). Modulation of AMPA currents by D2 dopamine receptors in striatal medium-sized spiny neurons: are dendrites necessary? *European Journal of Neuroscience*, *19*(9), 2455-2463.
- Holahan, M., & Routtenberg, A. (2008). The protein kinase C phosphorylation site on GAP-43 differentially regulates information storage. *Hippocampus*, *18*(11), 1099-1102.
- Hongpaisan, J., Xu, C., Sen, A., Nelson, T. J., & Alkon, D. L. (2013). PKC activation during training restores mushroom spine synapses and memory in the aged rat. *Neurobiology of Disease*, *55*, 44-62.
- Igaz, L. M., Bekinschtein, P., Vianna, M. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2004). Gene expression during memory formation. *Neurotoxicity Research*, *6*(3), 189-203.
- Igaz, L. M., Vianna, M. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6781-6789.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, *68*(3), 285-316.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short-and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, *103*(1), 1-11.
- Izquierdo, L. A., Vianna, M., Barros, D. M., e Souza, T. M., Ardenghi, P., Sant'Anna, M. K., ... & Izquierdo, I. (2000). Short-and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, *73*(2), 141-149.
- Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J. A., Walz, R., Da Silva, R. C., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1994). Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behavioral and Neural Biology*, *61*(2), 107-109.
- John, E. R. (1977). *Mecanismos de la memoria*. Trillas.

- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038.
- Kandel, E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and C/EBP. *Molecular Brain*, 5(1), 14.
- Kandel, E. R., & Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*, 218(4571), 433-443.
- Katz J.J., Halstead, W.C. (1950). Protein organization and mental function. *Comparative Psychology Monographs*, 20:1-38.
- Kelly, R. M., & Strick, P. L. (2004). Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Progress in Brain Research*, 143, 447-459.
- Keranen, L. M., Dutil, E. M., & Newton, A. C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Current Biology*, 5(12), 1394-1403.
- Kikkawa, U., Minakuchi, R., Takai, Y., & Nishizuka, Y. (1983). [31] Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) from rat brain. In *Methods in Enzymology* (Vol. 99, pp. 288-298). *Academic Press*.
- Kilpatrick, L. E., Sun, S., Li, H., Vary, T. C., & Korchak, H. M. (2010). Regulation of TNF-induced oxygen radical production in human neutrophils: role of δ -PKC. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(1), 153-164.
- Kim, E. C., Lee, M. J., Shin, S. Y., Seol, G. H., Han, S. H., Yee, J., ... & Min, S. S. (2013). Phorbol 12-myristate 13-acetate enhances long-term potentiation in the hippocampus through activation of protein kinase C δ and ϵ . *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 17(1), 51.
- Komatsuzaki, Y., Hatanaka, Y., Murakami, G., Mukai, H., Hojo, Y., Saito, M., ... & Kawato, S. (2012). Corticosterone induces rapid spinogenesis via synaptic glucocorticoid receptors and kinase networks in hippocampus. *PloS One*, 7(4), e34124.
- Komatsuzaki, Y., Murakami, G., Tsurugizawa, T., Mukai, H., Tanabe, N., Mitsuhashi, K., ... & Kawato, S. (2005). Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(4), 1002-1007.
- Koós, T., & Tepper, J. M. (1999). Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nature Neuroscience*, 2(5), 467-472.
- Kunishio, K., & Haber, S. N. (1994). Primate cingulo-striatal projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. *Journal of Comparative Neurology*, 350(3), 337-356.
- Kurtz, P., & Palfai, T. (1977). Mechanisms in retrograde amnesia: a case for biogenic amines. *Biobehavioral Reviews*, 1(1), 25-33.

- Kuzirian, A. M., Epstein, H. T., Gagliardi, C. J., Nelson, T. J., Sakakibara, M., Taylor, C., ... & Alkon, D. L. (2006). Bryostatin enhancement of memory in *Hermisenda*. *The Biological Bulletin*, 210(3), 201-214.
- Kreitzer, A. C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 127-147.
- Lavoie, B., & Parent, A. (1990). Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 299(1), 1-16.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934.
- McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 107(1), 3.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153(3742), 1351-1358.
- McGaugh, J. L. (1973). Drug facilitation of learning and memory. *Annual Review of Pharmacology*, 13(1), 229-241.
- McGaugh, J. L. (1989). Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. *Brain Research Bulletin*, 23(4-5), 339-345.
- McGaugh, J. L. (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Review of Neuroscience*, 12(1), 255-287.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.
- McGaugh, J. L. (2003). *Memory and emotion: The making of lasting memories*. Columbia University Press.
- McGaugh, J. L. (2015). Consolidating memories. *Annual Review of Psychology*, 66, 1-24.
- McGaugh, J. L., & Cahill, L. (1997). Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Behavioural Brain Research*, 83(1-2), 31-38.
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 205-210.
- McGaugh, J. L., Zornetzer, S. F., Gold, P. E., & Landfield, P. W. (1972). Modification of memory systems: some neurobiological aspects. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 5(2), 163-186.
- McGeorge, A. J., & Faull, R. L. M. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience*, 29(3), 503-537.
- McPhie, D. L., Matzel, L. D., Olds, J. L., Lester, D. S., Kuzirian, A. M., & Alkon, D. L. (1993). Cell specificity of molecular changes during memory storage. *Journal of Neurochemistry*, 60(2), 646-651.
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum

- facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or foot shock components. *Learning & Memory*, 14(10), 673-677.
- Medina, A. C., Torres-García, M. E., Rodríguez-Serrano, L. M., Bello-Medina, P. C., Quirarte, G. L., McGaugh, J. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2019). Inhibition of transcription and translation in dorsal hippocampus does not interfere with consolidation of memory of intense training. *Neurobiology of Learning and Memory*, 166, 107092.
- Meitzen, J., Pflipsen, K. R., Stern, C. M., Meisel, R. L., & Mermelstein, P. G. (2011). Measurements of neuron soma size and density in rat dorsal striatum, nucleus accumbens core and nucleus accumbens shell: differences between striatal region and brain hemisphere, but not sex. *Neuroscience Letters*, 487(2), 177-181.
- Milner, B. (1962). Les troubles de la memoire accompagnant des lesions hippocampiques bilaterales. *Physiologie de l'hippocampe*, 257-272.
- Milner, B. (1972). Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Neurosurgery*, 19(CN_suppl_1), 421-446.
- Milner, B., Corkin, S., & Teuber, H. L. (1968). Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of HM. *Neuropsychologia*, 6(3), 215-234.
- Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 445-468.
- Minakuchi, R., Takai, Y., Yu, B., & Nishizuka, Y. (1981). Widespread Occurrence of Calcium-Activated, Phospholipid Dependent Protein Kinase in Mammalian Tissues. *The Journal of Biochemistry*, 89(5), 1651-1654.
- Mochly-Rosen, D., Basbaum, A. I., & Koshland, D. E. (1987). Distinct cellular and regional localization of immunoreactive protein kinase C in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(13), 4660-4664.
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900). *Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss* (Vol. 1). JA Barth.
- Nambu, A. (2011). Somatotopic organization of the primate basal ganglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 26.
- Newton, A. C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 28495-28498.
- Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical Reviews*, 101(8), 2353-2364.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258(5082), 607-614.
- Noguès, X., Micheau, J., & Jaffard, R. (1994). Protein kinase C activity in the hippocampus following spatial learning tasks in mice. *Hippocampus*, 4(1), 71-77.

- Okada, M., Zhu, G., Yoshida, S., Hirose, S., & Kaneko, S. (2004). Protein kinase associated with gating and closing transmission mechanisms in temporoammonic pathway. *Neuropharmacology*, 47(4), 485- 504.
- Olds, J. L., Golski, S., McPhie, D. L., Olton, D., Mishkin, M. T., & Alkon, D. L. (1990). Discrimination learning alters the distribution of protein kinase C in the hippocampus of rats. *Journal of Neuroscience*, 10(11), 3707-3713.
- Osto, E., Kouroedov, A., Mocharla, P., Akhmedov, A., Besler, C., Rohrer, L., ... & Cosentino, F. (2008). Inhibition of protein kinase C β prevents foam cell formation by reducing scavenger receptor A expression in human macrophages. *Circulation*, 118(21), 2174-2182.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the basal ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), 563-593.
- Packard, M. G., & McGaugh, J. L. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(1), 65-72.
- Pakhotin, P., & Bracci, E. (2007). Cholinergic interneurons control the excitatory input to the striatum. *Journal of Neuroscience*, 27(2), 391-400.
- Parent, M. B., & McGaugh, J. L. (1994). Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Research*, 661(1-2), 97-103.
- Parent, M., Wallman, M. J., Gagnon, D., & Parent, A. (2011). Serotonin innervation of basal ganglia in monkeys and humans. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 41(4), 256-265.
- Park, M. R., Gonzales-Vegas, J. A., & Kitai, S. T. (1982). Serotonergic excitation from dorsal raphe stimulation recorded intracellularly from rat caudate-putamen. *Brain Research*, 243(1), 49-58.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., & Sacktor, T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, 313(5790), 1141-1144.
- Penfield, W., & Milner, B. (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Archives of Neurology & Psychiatry*, 79(5), 475-497.
- Pereira, P., Ardenghi, P., e Souza, T. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Training in the step-down inhibitory avoidance task time-dependently increases cAMP-dependent protein kinase activity in the entorhinal cortex. *Behavioural Pharmacology*, 12(3), 217-220.
- Pérez-Ruiz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin*, 22(4), 599-603.
- Prado-Alcalá, R. A. (1985). Is cholinergic activity of the caudate nucleus involved in memory? *Life Sciences*, 37,2135-2142.
- Prado-Alcalá, R. A. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. En: *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory*. Editado por J. L. McGaugh, F. Bermúdez-

Rattoni, y R. A. Prado-Alcalá, Lawrence Erlbaum Publishers, Mahawah, New Jersey, U.S.A. ISBN 0-8058-1573-2, pp. 57-65.

- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. (1977). Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research*, 138(1), 190-196.
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. (1979). Interference with caudate nucleus activity by potassium chloride. Evidence for a 'moving' engram. *Brain Research*, 172(3), 577-583.
- Prado-Alcalá, R. A., Bermúdez-Rattoni, F., Velázquez-Martínez, D. N., & Bacha, G. (1978). Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: Overtraining induced protection against behavioral deficits. *Life Sciences*, 23, 889-896.
- Prado-Alcalá, R. A., Haiek, M., Rivas, S., Roldan-Roldan, G., & Quirarte, G. L. (1994). Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology & Behavior*, 56(1), 27-30.
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., López, N. S., & Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, 23 (5-6), 501-508.
- Prado-Alcalá, R. A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Arancibia, S., & Quirarte, G. L. (2007). Enhanced learning protects the brain against the effects of amnesic treatments. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Edited by F. Bermúdez-Rattoni, Taylor and Francis Ltd., London. 2007. ISBN 0-8493-9070-2, pp. 175-191.
- Prado-Alcalá, R.A., González-Salinas, Antaramian, A., Quirarte, G.L., Bello-Medina, P.C., & Medina, A.C. (2020). Imbalance in cerebral protein homeostasis: Effects on memory consolidation. *Behavioural Brain Research* 393,112767. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112767>
- Quirarte, G. L., Galvez, R., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*, 808(2), 134-140.
- Ramakers, G. M., Pasinelli, P., Hens, J. J., Gispen, W. H., & De Graan, P. N. (1997). Protein kinase C in synaptic plasticity: changes in the in situ phosphorylation state of identified pre-and postsynaptic substrates. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 21(3), 455-486.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018
- Roldán, G., Bolaños-Badillo, E., González-Sánchez, H., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (1997). Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience Letters*, 230(2), 93-96.

- Romanelli, P., Esposito, V., Schaal, D. W., & Heit, G. (2005). Somatotopy in the basal ganglia: experimental and clinical evidence for segregated sensorimotor channels. *Brain Research Reviews*, 48(1), 112-128.
- Rosenegger, D., & Lukowiak, K. (2010). The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea*. *Molecular Brain*, 3(1), 1-10.
- Rosenegger, D., & Lukowiak, K. (2013). The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in *Lymnaea* memory extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 100, 64-69.
- Routtenberg A., & Rekart, J. L. (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends in Neurosciences*, 28, 12–19.
- Russchen, F. T., Bakst, I., Amaral, D. G., & Price, J. L. (1985). The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Research*, 329(1-2), 241-257.
- Saito, N., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., & Tanaka, C. (1988). Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. *Journal of Neuroscience*, 8(2), 369-382.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz, M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I., & Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 83.
- Sandberg, K., Sanberg, P. R., Hanin, I., Fisher, A., & Coyle, J. T. (1984). Cholinergic lesion of the striatum impairs acquisition and retention of a passive avoidance response. *Behavioral Neuroscience*, 98(1), 162.
- Schacter, D. L., & Wagner, A. D. (2013). *Learning and memory. Principles of Neural Science* (5th Ed.).
- Schneider, L. H., Murphy, R. B., & Coons, E. E. (1982). Lateralization of striatal dopamine (D2) receptors in normal rats. *Neuroscience Letters*, 33(3), 281-284.
- Sen, A., Hongpaisan, J., Wang, D., Nelson, T. J., & Alkon, D. L. (2016). Protein Kinase C ϵ (PKC ϵ) Promotes Synaptogenesis through Membrane Accumulation of the Postsynaptic Density Protein PSD-95. *Journal of Biological Chemistry*, 291(32), 16462-16476.
- Shirai, Y., & Saito, N. (2002). Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *The Journal of Biochemistry*, 132(5), 663-668.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., & Sternweis, P. C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*, 251(4995), 804-807.
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Galindo, L. E., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Effects of pretraining intrastratial administration of p-chloroamphetamine on inhibitory avoidance. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(1), 178-185.
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Quirarte, G. L., Galindo, L. E., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sciences*, 71(4), 391-399.

- Sonnenburg, E. D., Gao, T., & Newton, A. C. (2001). The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 45289-45297.
- Souza, M. M., e Souza, T. M., Vinade, E. R., Rodrigues, C., Choi, H. K., e Silva, T. D., ... & Izquierdo, I. (2002). Effects of posttraining treatments in the posterior cingulate cortex on short-and long-term memory for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 77(2), 202-210.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171-177.
- Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(2), 169-177.
- Stahelin, R. V., Digman, M. A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Melowic, H. R., Rafter, J. D., & Cho, W. (2005). Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C ϵ : Mechanistic differences between protein kinases C δ and C ϵ . *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19784-19793.
- Stahelin, R. V., Digman, M. A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Rafter, J. D., Melowic, H. R., & Cho, W. (2004). Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C δ . *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29501-29512.
- Stahelin, R. V., Wang, J., Blatner, N. R., Rafter, J. D., Murray, D., & Cho, W. (2005). The origin of C1A-C2 interdomain interactions in protein kinase C α . *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36452-36463.
- Stefani, A., Surmeier, D. J., & Kitai, S. T. (1990). Serotonin enhances excitability in neostriatal neurons by reducing voltage-dependent potassium currents. *Brain Research*, 529(1-2), 354-357.
- Steinberg, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological Reviews*, 88(4), 1341-1378.
- Stevens, C. F., & Sullivan, J. M. (1998). Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron*, 21(4), 885-893.
- Sullivan, M. A., Chen, H., & Morikawa, H. (2008). Recurrent inhibitory network among striatal cholinergic interneurons. *Journal of Neuroscience*, 28(35), 8682-8690.
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 228-235.
- Swanson, L. W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Research Bulletin*, 9(1-6), 321-353.

- Sweatt, J. D., Atkins, C. M., Johnson, J., English, J. D., Roberson, E. D., Chen, S. J., Newton, A., & Klann, E. (1998). Protected-site phosphorylation of protein kinase C in hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neurochemistry*, *71*(3), 1075-1085.
- Tanaka, C., & Saito, N. (1992). Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochemistry International*, *21*(4), 499-512.
- Tepper, J. M., & Bolam, J. P. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*, *14*(6), 685-692.
- Théodule, R. (1881). *Les maladies de la mémoire*. Paris: Germer Baillière.
- Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N. J., Jennings, K. A., Deisseroth, K., & Cragg, S. J. (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron*, *75*(1), 58-64.
- Torres-García, M. E., Medina, A. C., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2017). Differential effects of inactivation of discrete regions of medial prefrontal cortex on memory consolidation of moderate and intense inhibitory avoidance training. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 842.
- Van der Zee, E. A., Compaan, J. C., Bohus, B., & Luiten, P. G. (1995). Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC γ in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *Hippocampus*, *5*(4), 349-362.
- Virk, M. S., Sagi, Y., Medrihan, L., Leung, J., Kaplitt, M. G., & Greengard, P. (2016). Opposing roles for serotonin in cholinergic neurons of the ventral and dorsal striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(3), 734-739.
- Wang, X. Q., Yan, Q., Sun, P., Liu, J. W., Go, L., McDaniel, S. M., & Paller, A. S. (2007). Suppression of epidermal growth factor receptor signaling by protein kinase C- α activation requires CD82, caveolin-1, and ganglioside. *Cancer Research*, *67*(20), 9986-9995.
- Westheimer, F. H. (1987). Why nature chose phosphates. *Science*, *235*(4793), 1173-1178.
- Wetsel, W. C., Khan, W. A., Merchenthaler, I., Rivera, H., Halpern, A. E., Phung, H. M., ... & Hannun, Y. A. (1992). Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *The Journal of Cell Biology*, *117*(1), 121-133.
- White, N. M., & McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *77*(2), 125-184.
- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(6), 464-476.
- Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *European Journal of Neuroscience*, *22*(2), 513-523.
- Young, E., Cesena, T., Meiri, K. F., & Perrone-Bizzozero, N. I. (2002). Changes in protein kinase C (PKC) activity, isozyme translocation, and GAP-43 phosphorylation in the rat hippocampal formation after a single-trial contextual fear conditioning paradigm. *Hippocampus*, *12*(4), 457-464.

Zhou, J., Fariss, R. N., & Zelenka, P. S. (2003). Synergy of epidermal growth factor and 12 (S)-hydroxyeicosatetraenoate on protein kinase C activation in lens epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 5388-5398.