



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“LA RECONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DEL
CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR
EN RATAS, NO ES DEPENDIENTE DE SU
EVOCACIÓN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A :

CONSUELO PÉREZ SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE**

2010



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.

"Though it all looks different now, I know it's still the same"

NIN

AGRADECIMIENTOS

Poner en palabras a las personas que quiero agradecer por ayudarme y enseñarme durante este periodo de mi vida no es algo sencillo. Son muchas las personas que han dejado algo suyo durante este cachito de mi vida.

En primer lugar quiero agradecerle a las personas que en conjunto forman el laboratorio de Aprendizaje y Memoria del IFC, en especial al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, quién me permitió realizar esta tesis dentro de su laboratorio y me brindó su valiosa asesoría.

Quiero agradecerle especialmente a mi tutora Paola García de la Torre por la paciencia que me ha tenido, por compartir sus conocimientos conmigo así como sus valiosos consejos y el cariño que me ha mostrado. Además de la confianza que ha depositado en mi y en mi trabajo y brindarme su amistad. ¡¡Muchas gracias Paola!!

Agradezco a Cristina y Paulina por su importantísima colaboración durante la realización de este trabajo y haberme hecho pasar buenos momentos.

En especial a Cristina, Julio, Azul, Kioko, Lucía, Daniel y Lalito por ser como son, ofrecerme su valiosa amistad, ayuda, consejos, risas y por todas las experiencias que compartimos juntos (algunas tristes y otras muy alegres) y por hacer del laboratorio un mejor lugar, los quiero.

Armando te agradezco todo el apoyo y los consejos que me diste cuando pase por momentos difíciles, también que me hayas ofrecido algo más que tu amistad todos los buenos momentos y experiencias que compartimos nunca los olvidaré.

Gracias a todos lo demás compañeros del laboratorio por su apoyo, tiempo, platicas y consejos.

A Vanesa muchas gracias por permitirme conocerte, estés donde estés siempre te recordaré

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que me han apoyado incondicionalmente en todo momento, porque me han dado todo en esta vida, me aman y yo también a ellos. No se que haría sin ellos. A ustedes les dedico este trabajo.

A Rosa porque se que estarías muy orgullosa de mi, te amo y te extraño mucho. Todo lo que tengo y tendré es por ti.

A mis incondicionales amigas Chispa, Chapis, Chivis, Dosta y Elina por todo su apoyo, consejos, amistad, momentos de risa y llanto. Son las mejores, las adoro.

A mis amigos de la fac que me han visto convertirme en bióloga y en mejor persona.

A tí, que aún cuando me causas conflicto, no me has abandonado y me has dado cosas maravillosas.

¡¡Gracias!!

Cheliux.

INDICE

Resumen	7
I. INTRODUCCIÓN	8
1.1 La consolidación	10
II. MEMORIA GUSTATIVA	12
2.1 El condicionamiento de aversión al sabor	13
2.2 La corteza insular y su participación en la memoria gustativa	15
2.3 La amígdala y su participación en la memoria gustativa	16
III. LARECONSOLIDACIÓN	18
3.1 La actualización de la memoria	20
IV. EL GLUTAMATO	21
4.1 Receptores AMPA en la evocación de la memoria	24
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS, OBJETIVO	26
5.1 Planteamiento del problema	26
5.2 Hipótesis	26
5.3 Objetivo	26
VI. METODOLOGIA	27
6.1 Sujetos	27
6.2 Cirugía e implantación de cánulas	27
6.3 Fármacos	28
6.4 Inyecciones	28
6.5 Histología	28
6.6 Procedimientos conductuales	29
6.7 Inyección del inhibidor de la síntesis de proteínas y el NBQX durante la asíntota de desempeño	29
6.8 Inyección de anisomicina y NBQX antes de la adquisición del segundo CAS	29

6.9	Análisis estadísticos	30
VII.	RESULTADOS	31
7.1	Histologías	31
7.2	Inhibición de la síntesis de proteínas y bloqueo de receptores AMPA (Experimento 1)	32
7.3	Inyección de Anisomicina y NBQX en asíntota de CAS (Experimento 2)	33
VIII.	DISCUSIÓN	35
IX.	CONCLUSIONES	42
X.	LITERATURA CITADA	43

RESUMEN

La reconsolidación se ha definido como un proceso mediante el cual la memoria previamente almacenada, es reactivada y posteriormente estabilizada. Se ha sugerido que es un proceso de actualización que permite la integración de nueva información a un trazo de memoria previamente consolidado. Se sabe que la corteza insular (CI) y la amígdala basolateral (ABL) participan en el consolidación a largo plazo de la memoria gustativa de aversión al sabor a través de la síntesis de proteínas. Además, en un trabajo previo observamos que tanto la CI como la ABL son necesarias para que la reconsolidación del condicionamiento de aversión al sabor (CAS) ocurra. Recientemente se demostró que los receptores AMPA en la ABL son necesarios para la evocación de la memoria de aversión, sin embargo, no son necesarios para adquirir y consolidar dicha memoria. Por lo anterior en este trabajo se evaluó la participación de la evocación en la reconsolidación de una memoria de aversión. Para esto se utilizó el protocolo del CAS, en el cual se asocia un sabor (sacarina) como estímulo condicionado (EC) con un inductor de malestar gástrico (cloruro de litio), como estímulo incondicionado (EI); como respuesta a esta asociación el animal evita beber el sabor en las presentaciones posteriores. En una segunda adquisición del CAS se realizó una inyección de un antagonista de receptores AMPA (NBQX) en la ABL y de un inhibidor de síntesis de proteínas (anisomicina) en la amígdala y CI al mismo tiempo. Un día después se presentó el EC en una prueba de memoria. Los animales inyectados con NBQX y anisomicina no fueron capaces de expresar la conducta adquirida (evocar) además de ser incapaces de reconsolidar, es decir, no adquirieron el segundo condicionamiento y además se vio afectada la adquisición anterior (CAS1). Sin embargo, los animales que únicamente se inyectaron con NBQX no evocaron la memoria pero sí la reconsolidaron. Con estos resultados podemos concluir que la evocación no es necesaria para la reconsolidación de la memoria, además nuestros resultados proporcionan evidencia de una posible disociación molecular de los mecanismos que controlan y regulan el proceso de reconsolidación y evocación de una memoria.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos son capaces de responder a las exigencias de su medio y adaptarse a él, estas características se reflejan en cambios en su conducta que son resultado del aprendizaje y la memoria. El aprendizaje es la capacidad de adquirir conocimiento y comúnmente da como resultados cambios en la conducta. Al proceso por el cual este aprendizaje es almacenado y recuperado a lo largo del tiempo se le denomina memoria (Kandel et al 2000). Es decir, la memoria es una herramienta indispensable en la naturaleza que nos permite sobrevivir a un medio de condiciones variantes por medio de la modificación de nuestra conducta de acuerdo a lo aprendido en experiencias previas.

Se ha establecido que una memoria capaz de durar en el tiempo presenta tres fases: adquisición, consolidación y evocación (figura 1). La adquisición o codificación es la entrada de nueva información para ser procesada (Kesner y Rogers, 2004). La consolidación se refiere al proceso de almacenamiento de la memoria a largo plazo, a través de la síntesis de proteínas (McGaugh, 2000) y la evocación es la expresión de la conducta por la experiencia e involucra la recuperación de la información almacenada (Baddeley, 1999).

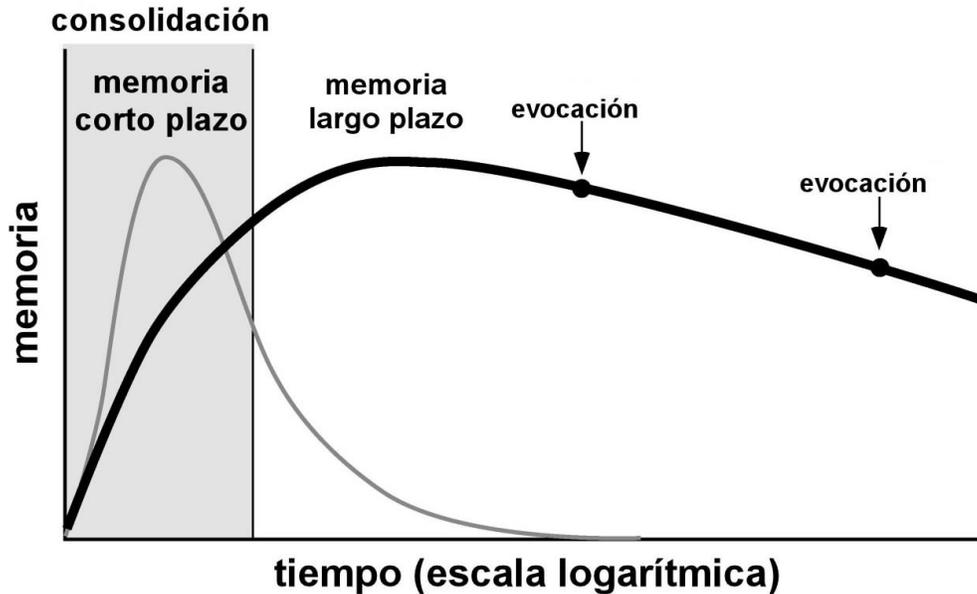


Figura 1. Fases de la memoria. En esta gráfica se muestra la intensidad de la memoria a lo largo del tiempo. La memoria de corto plazo (MCP) se mantiene por lapsos cortos, hasta que es consolidada y la información adquirida se almacena como memoria de largo plazo (MLP). La información puede ser utilizada posteriormente en el tiempo por medio de su evocación (Modificado de Dudai, 2004).

El aprendizaje, como una propiedad del sistema nervioso, depende de las características plásticas de los circuitos cerebrales que son capaces de reorganizar funcionalmente las representaciones del mundo en respuesta a cambios en la información entrante relevante (Bermúdez-Rattoni, 2007). Estos son los llamados trazos de memoria que crean cambios estructurales en ciertas regiones del cerebro como resultado de la información almacenada, estos trazos representan el sustrato biológico de la memoria (Tronson y Taylor, 2007).

A lo largo de la historia la memoria ha sido objeto de estudio para todas las culturas; su estudio formal comenzó en el siglo XIX con los estudios del alemán Hermann Ebbinghaus, quien en su trabajo "Über das Gedächtnis" (Sobre la memoria), realizó un análisis sistemático de la memoria por medio de experimentos basados en la memorización de sílabas sin sentido con lo cual realizó una curva de aprendizaje. A través de estos experimentos observó una relación entre el tiempo y

la capacidad para recordar las sílabas, ya que entre mayor era el tiempo después de la adquisición, menor número de sílabas podían recordar. Posteriormente, William James en su obra "*Principles of Psychology*" (*Principios de psicología*) realizó una distinción entre lo que él llamó memorias primarias y memorias secundarias (Martínez y Kesner, 1998). Las primeras las definió como el conocimiento que no era necesario evocar porque no ha abandonado el curso principal de nuestro conocimiento, mientras las segundas se refieren a la información que ha dejado de ocupar nuestra atención y de la que hemos dejado de tener conciencia pero que puede recuperarse a voluntad cuando se necesite (Bermúdez-Rattoni y Prado, 2001). En la actualidad se hace referencia a los dos tipos de memoria análogos a los propuestos por James; la memoria de corto plazo (MCP), cuando es de duración corta y va de segundos a horas y, la memoria de largo plazo (MLP) cuando la duración es mayor, días, meses o años (Dudai, 1993).

La Consolidación

Para su almacenamiento a largo plazo, la memoria debe ser consolidada. El término de consolidación se atribuye a Müller y Pilzecker quienes observaron que las memorias tardan tiempo en fijarse (Dudai, 2004). Ellos encontraron que la memoria recién aprendida era interrumpida por el aprendizaje de otro tipo de información si éste era presentado poco tiempo después, sugiriendo así que los procesos que subyacen a las memorias nuevas persisten en un inicio en un estado frágil y se consolidan a través del tiempo para su mantenimiento a largo plazo (McGaugh, 2000).

De acuerdo con la hipótesis de la consolidación, un trazo de memoria se estabiliza y es capaz de fortalecerse a través del tiempo. Experimentalmente se ha demostrado que ciertos tratamientos pueden interrumpir este proceso. En los años cuarenta se reportó que los choques electroconvulsivos después del entrenamiento

producen un deterioro en la memoria; sin embargo, cuando el mismo tratamiento fue aplicado en puntos progresivamente más distantes en el tiempo al entrenamiento, los animales mostraron una reducción significativa y gradual en el deterioro de la memoria (Duncan, 1949). Los estudios de Duncan concuerdan con la hipótesis de Müller y Pilzecker, ya que propone que el aprendizaje requiere tiempo para estabilizarse en una memoria duradera.

Durante la década de los sesenta se fomentó el desarrollo de múltiples estudios que demostraron que la administración farmacológica de inhibidores de síntesis de proteínas, después del entrenamiento, provocaban que la MLP se viera afectada (Flexner et al, 1962). Al contrario, la MCP no presentaba ningún deterioro con la aplicación del mismo tratamiento. Por ejemplo, en un entrenamiento en un laberinto en forma "T" entrenaron ratones para que aprendieran a escapar de un brazo a otro ya que en uno de ellos recibían choques eléctricos. Al administrar acetociclohexitida (un inhibidor de la síntesis de proteínas) intracerebralmente 5 horas antes del entrenamiento y realizando la prueba 3 horas después del mismo, no se observó un deterioro en la MCP. Sin embargo, cuando la prueba fue realizada en horas posteriores o incluso días después, la MLP estaba severamente afectada (Barondes y Cohen, 1967). Como conclusión de estos trabajos, se estableció que la consolidación es el periodo durante el cual nuevas proteínas son sintetizadas en las neuronas para almacenar la información adquirida a largo plazo (McGaugh, 2000).

El proceso celular responsable de la formación de una memoria de corto plazo implica sólo la activación de cascadas de transducción, proceso por el cual la célula transforma una señal extracelular en una respuesta celular. Para el almacenamiento de la memoria a largo plazo en cambio, las señales de transducción llegan al núcleo celular en donde se lleva a cabo la transcripción que a su vez, desencadena la traducción del RNA el cual finalmente lleva a la síntesis

de nuevas proteínas, las cuales produce alteraciones temporales de la transmisión sináptica en modificaciones persistentes de la arquitectura sináptica. A esto se le conoce como consolidación celular o sináptica (Dudai, 2004).

MEMORIA GUSTATIVA

En la naturaleza, los organismos se enfrentan a la tarea de encontrar nutrientes y conservarlos. Una de las estrategias para que los seres vivos puedan encontrar comida y bebida es la capacidad de recordar un sabor previamente experimentado, esto es la memoria de reconocimiento de sabores. Cuando un animal se encuentra ante un sabor novedoso consume poco de este alimento ya que desconoce las consecuencias gástricas que le pueda traer, a esto se le conoce como neofobia (NF). Después de una primera presentación del sabor, se pueden formar dos memorias en el organismo: una memoria gustativa segura o una memoria gustativa aversiva. El tipo de memoria se determina de acuerdo a las consecuencias gástricas del consumo del alimento y se puede medir en presentaciones posteriores de acuerdo al aumento o disminución del consumo. Por ejemplo, cuando el sabor no tiene ninguna consecuencia tóxica o es agradable para el animal este incrementa su consumo presentando una atenuación a la neofobia (ANF). Por el contrario, cuando el sabor tiene una consecuencia de malestar, el sabor se registra como tóxico y en consecuencia el animal se rehúsa a seguirlo consumiendo presentando una aversión a dicho sabor. A esta conducta se le conoce como condicionamiento de aversión a los sabores (CAS) (Bermúdez-Rattoni, 2004). En la figura 2 se representa la línea conductual de los animales en ambos casos (sabor seguro o sabor aversivo) para la memoria de sabores.

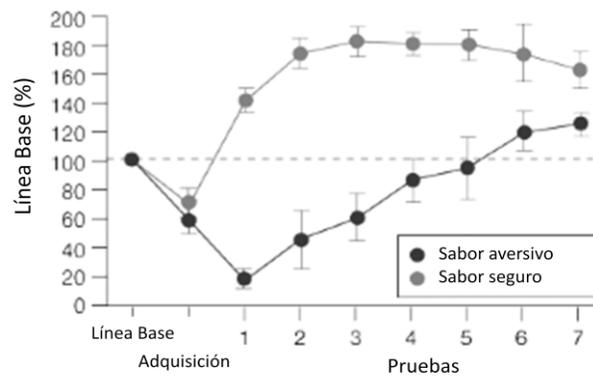


Figura 2. En esta figura se muestran dos tipos de conducta que se observan como consecuencia de haber ingerido un sabor nuevo. La primer presentación del sabor (adquisición) es la neofobia. Cuando el sabor se codifica como seguro en presentación posteriores se incrementará el consumo (atenuación de la neofobia), o bien si se asocia el sabor novedoso con un malestar gástrico el consumo siguiente disminuirá (aversión a los sabores) e irá aumentando en los días siguientes al no presentar consecuencias gástricas nocivas, este fenómeno se conoce como extinción (Modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

El condicionamiento de aversión al sabor.

El CAS es un paradigma conductual descrito por John García en 1955, en el cual un sabor es utilizado como un estímulo condicionado (EC) y es asociado a un malestar gástrico inducido (estímulo incondicionado; EI), que comúnmente consiste en una inyección de cloruro de litio (LiCl) intraperitoneal. Como resultado, el animal asocia el EC con el EI presentando una disminución en el consumo del sabor como se observa en la figura 2. El CAS se esquematiza en la figura 3.

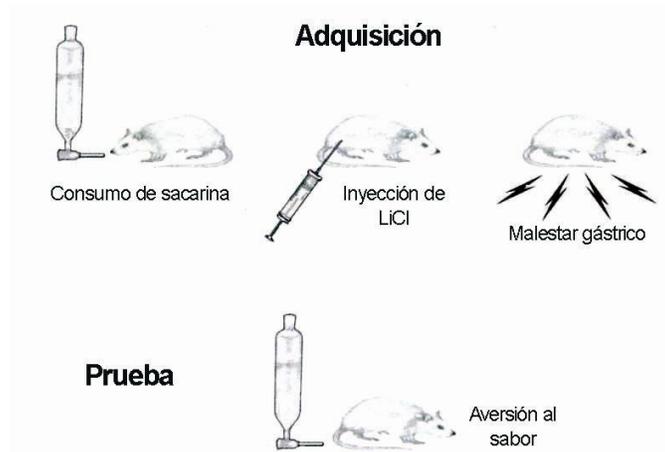


Figura 3. Representación esquemática del CAS. Podemos ver la presentación del EC (sacarina) y el EI (inyección de LiCl). Cuando el sabor es presentado de nuevo al animal este evita su consumo debido a las consecuencias gástricas (Modificado de Bermudez-Rattoni y Prado, 2001).

Ambos tipos de memoria gustativa: memoria segura y memoria de aversión, dependen de una representación neural del sabor, que puede ser procesada en paralelo en diversas regiones cerebrales cambiando su dirección hacia seguro o aversivo, dependiendo de las consecuencias del consumo de un sabor. A esta representación neural se le llama trazo de memoria del sabor (TMS; Bermudez-Rattoni, 2004).

El CAS cuenta con características muy favorables que lo hacen un paradigma conductual muy utilizado en el estudio de la memoria. Es de rápida adquisición; se requiere de sólo un apareamiento entre el sabor (EC) y el inductor del malestar gástrico (EI) para ver los efectos conductuales a largo plazo. El aprendizaje es fuerte y duradero por lo que proporciona una ventana clara de tiempo en la cual se pueden identificar señales neuronales. Además, se conocen algunas de las estructuras cerebrales implicadas en el procesamiento de esta memoria. Por otra parte, se puede adquirir aunque existan amplios intervalos entre la presentación de los dos estímulos (EC y EI); la posibilidad de separar los estímulos permite

estudiar los mecanismos involucrados entre las distintas fases del procesamiento de la información (Bernstein y Koh, 2007).

La Corteza Insular y su participación en la memoria gustativa

La corteza insular (CI) es una región involucrada en el procesamiento y almacenamiento de la memoria gustativa. En la rata se encuentra en la superficie lateral del cerebro, y está delimitada por un área que abarca desde la corteza frontal hasta la corteza perirrinal en dirección al rostro caudal, en su parte ventral va desde la corteza somatosensorial hasta la corteza periforme. La CI ha sido referida como corteza visceral ya que recibe información de tipo gustativa y conexiones del tálamo, pero sus principales conexiones provienen del sistema límbico, que son las aferencias de la amígdala (Bures et al, 1998). La CI además de encargarse de procesar información gustativa en la rata, ha sido relacionada fuertemente con la consolidación del CAS y la atenuación de la neofobia (Bermúdez-Rattoni, 2004).

La CI recibe proyecciones de acetilcolina provenientes del núcleo magno basal y fibras glutamatérgicas provenientes de la amígdala, tálamo y de conexiones corticocorticales (Davis et al, 1994). Estudios electrofisiológicos muestran que la CI presenta características diferenciales en cuanto a estimulación por medio de un sabor determinado. Las neuronas que se estimulan preferentemente con un sabor dulce se encuentran en la parte rostral, y con quinina primordialmente en la región caudal y la región granular. Esto ha sugerido que la CI es la región responsable de la percepción gustativa, que no está exenta de recibir otro tipo de información sensorial, por lo que es considerada como una estructura multimodal en donde se procesan las señales sensoriales (Yamamoto et al, 1989).

En un estudio realizado por Ferreira y colaboradores en el 2002, inyectaron APV, un antagonista de los receptores NMDA (glutamatérgicos), una hora antes o una hora después de la presentación del sabor novedoso en un protocolo de CAS y observaron un bloqueo de la formación de la memoria de aversión. Así mismo, un estudio de Gutiérrez y colaboradores del 2003 demostró que bloqueando los receptores NMDA antes de presentar el sabor ni la neofobia ni su atenuación se ven afectadas. De acuerdo a los artículos anteriores se puede decir que la memoria de aversión requiere de la liberación de glutamato en la corteza insular para su formación. Además, se ha reportado que la formación de la memoria de aversión activa al factor de transcripción CREB (cAMP response-element-binding) en la corteza insular (Desmedt et al., 2003), induciendo la síntesis de proteínas necesaria para la consolidación de la memoria de aversión en esta estructura cortical (Rosenblum et al., 1993).

La Amígdala y su participación en la memoria gustativa

La amígdala es una estructura que se ha asociado en la adquisición y retención de memorias emotivas (McGaugh, 2004). Se ha relacionado con tareas de aversión como el condicionamiento al miedo y la prevención pasiva, así como con respuestas emocionales como el miedo y la agresión (LeDoux, 1993). Se sabe que la síntesis de proteínas de novo es necesaria en el núcleo central de la amígdala para la consolidación del CAS (Yamamoto y Fujimoto 1991; Yamamoto 2007).

En el cerebro de la rata la amígdala forma parte del lóbulo temporal medial y participa en complejos parámetros moduladores de la integración de la conducta, tales como aprendizaje y mecanismos de defensa. Además se sabe que la amígdala es un componente indispensable para la evaluación de la relevancia de la información externa e interna del cuerpo y puede coordinar una respuesta conductual (Wright *et al.*, 1996). La amígdala en ratas puede dividirse en cuatro

núcleos: central (ACe), medial, basomedial y cortical, y basolateral (ABL) (figura 5) (Swanson L. W., 1992).

La amígdala manda información al área hipotalámica lateral, el núcleo parabrancual, la médula ventrolateral y el núcleo del tracto solitario, mayoritariamente a la región parvicelular y en menor proporción a la ventrolateral (Spray *et al.*, 2004). La ACe tiene conexiones con núcleo del tracto solitario, núcleo parabrancual, la región agranular y el complejo talámico posterior intra laminar (zona inserta) de la corteza insular. Las neuronas del núcleo central, región lateral, responden mayoritariamente a información cardiovascular y visceral provenientes de la ínsula granular, disgranular visceral y agranular posterior (McDonald, 1999). La ABL recibe información viscerosensorial de corteza insular, complejo talámico posterior intra laminar y del núcleo central de la amígdala.

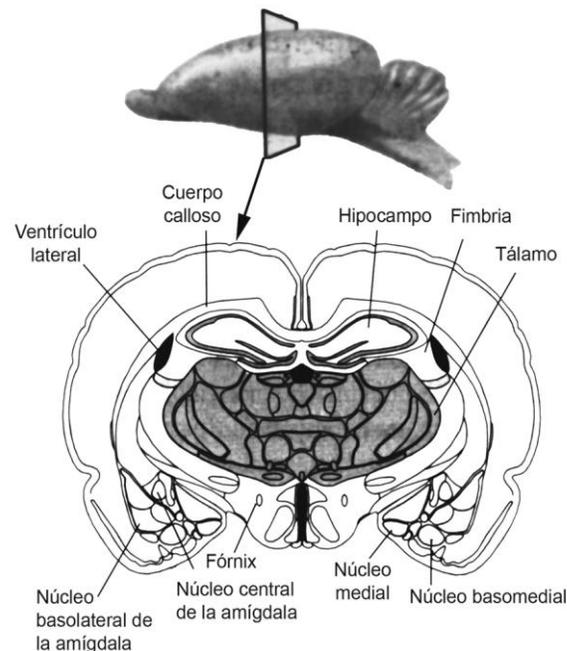


Figura 5. Sección coronal del cerebro de ratona en la que se muestra la localización de la amígdala y sus núcleos (Modificado de Swanson L. W., 1992).

LA RECONSOLIDACIÓN

A finales de la década de los setenta, se planteó que una memoria previamente consolidada puede regresar a un estado lábil, susceptible a la inhibición de la síntesis de proteínas, tras ser evocada. A este proceso se le dio el nombre de reconsolidación (Spear, 1973). El primer estudio sobre este proceso fue realizado por Misanin y colaboradores en 1968, quienes entrenaron a un grupo de ratas en una tarea de condicionamiento al miedo. Las ratas fueron habituadas a beber de una botella en una cámara en la que posteriormente se colocó al animal y tras escuchar un tono (estímulo condicionado) recibía una descarga eléctrica en las patas (estímulo incondicionado). Después de varias asociaciones entre los dos estímulos, se obtenía una respuesta condicionada que consiste en una conducta de inmovilidad. Durante la prueba presentaron nuevamente el tono y se utilizó como variable del reflejo de la memoria el número de lengüetazos a la botella durante el tono. La prueba de memoria se realizó 24 horas después del entrenamiento, el tratamiento de choques posterior a la presentación del tono provocó una falta de memoria cuando ésta fue evaluada un día después de los choques. A este fenómeno se le denominó amnesia dependiente de clave y es lo que ahora se conoce como reconsolidación (Misanin et al, 1968).

En 1979 Lewis propuso un modelo (figura 6) que explicaba los estados de la memoria como memoria activa y memoria inactiva. En su modelo propone que las memorias nuevas y reactivadas son estabilizadas a través del tiempo pasando a un estado inactivo. Pero al ser recordadas las memorias inactivas pueden regresar a un estado activo (Lewis, 1979). Es decir, la memoria puede regresar a un estado lábil y necesitar ser reconsolidada al ser reactivada para ser estabilizada de nuevo.

El modelo más común de la formación de la memoria supone que las memorias pueden hacer una transición de MCP a MLP en el tiempo como resultado de la

consolidación. Aunque la MLP puede ser olvidada, se piensa que es un estado de relativa permanencia y estabilidad. El descubrimiento de que tras ser reactivada, una memoria puede requerir una estabilización adicional (ser reconsolidada) rompe por completo con este modelo lineal de memoria y propone uno más dinámico en el que nueva información puede ser incorporada a un trazo previamente consolidado (Nader, et al 2009).

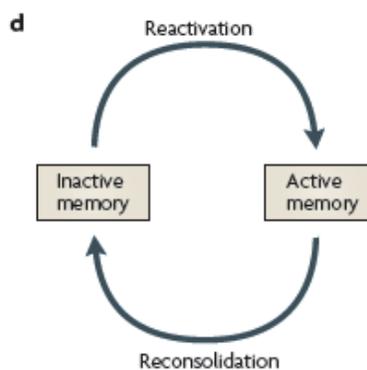


Figura 6. Modelo de Lewis. El modelo de Lewis propone que una memoria inactiva puede pasar mediante su reactivación (al ser evocada) a un estado activo y después ser reconsolidada para su posterior estabilización (Modificado de Nader et al., 2009).

En el 2000, Nader y colaboradores retomaron la idea de que una memoria podía ser afectada después de su consolidación y demostraron que ésta se volvía susceptible a la inhibición de la síntesis de proteínas al ser evocada (reactivada). En este trabajo utilizaron el condicionamiento al miedo, el cual consiste en asociar un tono a un choque eléctrico, y 24 horas después realizaron una sesión de evocación (se tomó como índice de memoria la inmovilidad de los animales al escuchar el tono) e inmediatamente después se inyectó anisomicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) en la ABL. Se observó un decremento en el tiempo de inmovilización, o congelamiento al realizar una segunda evocación 24 horas más tarde, pudiéndose observar el mismo efecto hasta 14 días después del entrenamiento. Por lo tanto se propuso que la reconsolidación es un proceso en el cual las memorias evocadas

regresan a un estado de vulnerabilidad similar al de las recién adquiridas ya que también requieren de la síntesis de proteínas de novo (Strekalova et al, 2003) durante una ventana corta de tiempo después de su reactivación (Debiec et al, 2002; Milekik y Alberini, 2002; Taubenfeld et al, 2001).

La actualización de la memoria

Estudios recientes sugieren que la reconsolidación es parte de un proceso de actualización que permite la integración de nueva información a un trazo de memoria previamente consolidado (Sara, 2000; Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Morris et al, 2006; Hupbach et al., 2007; Lee 2008). En el trabajo de Rodriguez-Ortiz y colaboradores (2005) se utilizó la tarea de atenuación de la neofobia (AN) en ratas y a través de la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular pudieron afectar la reconsolidación de esta tarea. La AN consiste en presentar un sabor novedoso al animal que consumirá poco por no conocer las consecuencias de su consumo, si este sabor no ocasiona malestar en presentaciones posteriores, el animal incrementará el consumo del sabor hasta llegar a una asíntota conductual. En la figura 7, se observa que no sólo se afectó la consolidación de una segunda presentación del sabor, sino que se afecta parte de la adquisición anterior, sugiriendo que se afectó el trazo previo de la memoria de manera parcial. Sin embargo, cuando se dio el tratamiento después de la sexta presentación del sabor, cuando ya se ha llegado a una asíntota conductual, el tratamiento no tuvo ningún efecto. Lo anterior sugiere que si no existe información relevante, la memoria ya no es susceptible a ser afectada.

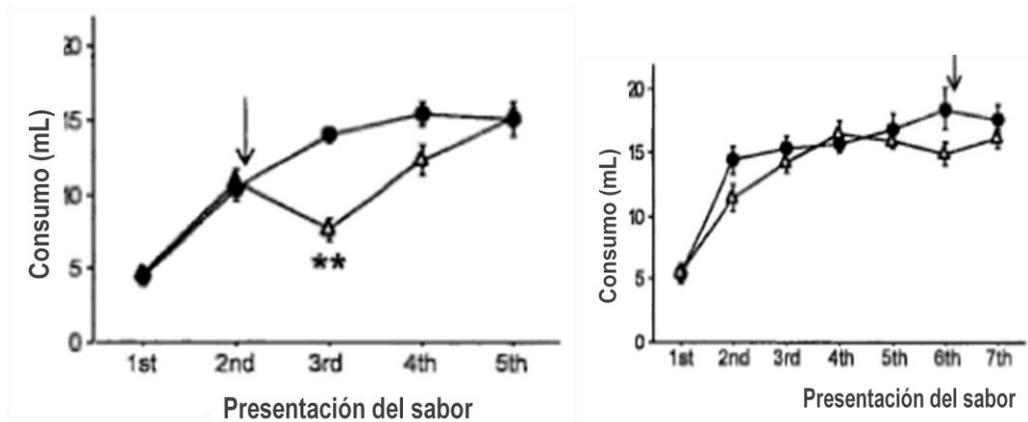


Figura 7. Aquí se muestra que la inhibición de la síntesis de proteínas puede afectar el trazo previo de memoria de manera parcial. Se presenta el consumo en mL de sacarina a través de cinco días, se observa que los animales inyectados con anisomicina inmediatamente después de la segunda presentación del sabor tienen un consumo menor(**) al día anterior durante el tercer día en comparación con los vehículos que incrementan su consumo. Si se ha llegado a una asíntota de desempeño, la anisomicina ya no tiene ningún efecto sobre la memoria (segunda gráfica) (Modificado de Rodríguez-Ortiz et al., 2005).

Por lo tanto, se ha propuesto como hipótesis que la reconsolidación es un proceso de actualización, dependiente de síntesis de nuevas proteínas y por medio del cual es posible agregar información relevante a la memoria previamente establecida (Sara 2000; Rodríguez-Ortiz et al., 2007; Lee et al., 2008).

EL GLUTAMATO

El glutamato es el neurotransmisor excitador del sistema nervioso central por excelencia. Su participación es muy importante en distintos procesos como la coordinación motora, las emociones, la cognición, así como también la formación y evocación de la memoria (Siegel et al., 1999). Es uno de los neurotransmisores más estudiados en el contexto de la plasticidad sináptica, proceso que se refiere a las modificaciones en las sinapsis que son necesarias para almacenar memorias (Martin et al, 2000). Éste se ha visto involucrado en la plasticidad dependiente de experiencia y en la consolidación de la memoria (Bermúdez-Rattoni, 2004). Es un

aminoácido del tipo no esencial y su síntesis se da en neuronas a partir de precursores que se encuentran en ellas. Su precursor principal es la glutamina, la cual se libera por células de la glía, ésta es metabolizada por una enzima llamada glutaminasa en la terminal de la neurona presináptica para después ser empaquetado en vesículas que son liberadas durante la transmisión sináptica. Dicho proceso es dependiente de ATP y magnesio (Purves *et al.*, 2003).

Los receptores de glutamato han sido divididos en dos grupos: ionotrópicos y metabotrópicos (Purves *et al.*, 2003). Entre los receptores ionotrópicos existen tres tipos nombrados de acuerdo a los agonistas que provocan su activación; receptores NMDA, receptores AMPA y receptores kainato (Figura 10). Los receptores del tipo NMDA son canales no selectivos a cationes que permiten la entrada de calcio, sodio y potasio, y dependen de la presencia de un co-agonista (glicina) y de la liberación del magnesio que bloquea el canal cuando no está activo. La activación del canal ocurre cuando se despolariza la presinápsis y se libera el ión magnesio para así permitir el paso de iones.

Los receptores de tipo AMPA funcionan durante la transmisión excitatoria rápida y su activación provoca la mayoría de las despolarizaciones neuronales (Siegel *et al.*, 1999). Se compone de subunidades Glu R1, R2, R3 y R4 y formados pueden ser bloqueados específicamente por compuestos químicos como quinoxalinedionas, un ejemplo de éstas es el NBQX (6-nitro-7-sulfamobenzo[f] quinoxalina-2,3-diona). El NBQX es un antagonista competitivo de los receptores AMPA pero tiene un efecto débil o nulo en otros receptores (Siegel *et al.*, 1999).

Se sabe que los receptores NMDA y AMPA deben coexistir en la misma célula ya que actúan de manera sinérgica en la mayoría de los casos. Una estimulación puede provocar la liberación presináptica de glutamato, el cual se une a sus respectivos receptores, pero únicamente se activan los tipo AMPA que permiten la

entrada de sodio y potasio a la postsinapsis, dichos iones provocan un aumento en el potencial de membrana, el cual al alcanzar un umbral, provoca la despolarización de la membrana que expulsa al tapón de magnesio del receptor NMDA, éste último ahora es capaz de responder al glutamato que se une a él, dejando entrar sodio y calcio.

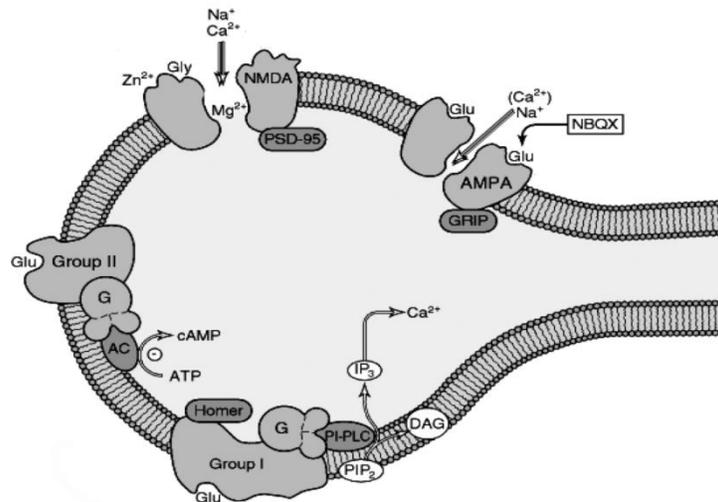


Figura 8. Esquema de receptores glutamatergicos. Se muestran dos tipos de receptores ionotrópicos, NMDA y los AMPA, así como también los receptores metabotrópicos tipo I y tipo II. Se muestra en un rectángulo el antagonista de receptores AMPA (NBQX). Las dos clases de receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G unidas a fosfolipasas (PI-PLC) para el grupo I (Group I) y a adenilato ciclasa (AC) para el grupo II (Group II). La activación de los receptores tipo II provocan que la proteína AC quede inactiva. Se cataliza la producción de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) a fosfatidilinositol-bifosfato (PIP₂) por la proteína PI-PLC. Al aumentar el IP₃ se provoca un aumento en la liberación de calcio presente en vesículas intracelulares. Otra proteína llamada Homer tiene como papel anclar estos receptores a la membrana sináptica. (Modificado de Siegel et al., 1999).

Receptores AMPA en la evocación de la memoria

En años recientes se han realizado estudios de tareas aversivas en los cuales la expresión de la memoria durante su evocación es afectada como consecuencia de la inhibición de los receptores AMPA a través de infusiones de CNQX (un antagonista de receptores AMPA).

En un estudio reciente de nuestro laboratorio se realizaron inyecciones de NBQX en la ABL durante la evocación de un protocolo de CAS. Los animales inyectados con el antagonista de AMPA antes de una segunda adquisición no presentan aversión el día de la evocación de la primera adquisición, sin embargo presentan una aversión similar a la del grupo control el día de la prueba de memoria. Este resultado indica que adquirieron y consolidaron el segundo CAS pero que no evocaron el primer CAS el día de la inyección. Este trabajo apoya la hipótesis de que la evocación de la memoria de aversión al sabor se puede afectar con el bloqueo de los receptores AMPA sin afectar la consolidación de la memoria en un protocolo de actualización.

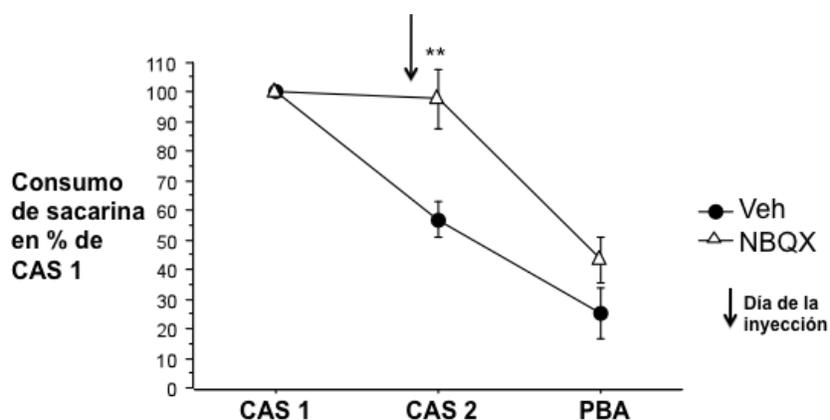


Figura 9. Bloqueo de receptores AMPA en la ABL durante la evocación del CAS. En esta figura se muestran los consumos (en % de CAS 1) de ambos grupos de las dos adquisiciones del CAS y de la prueba. Se puede observar el efecto del fármaco en la evocación de la memoria de aversión al sabor pero no así en su adquisición o consolidación. La flecha indica el momento de la microinyección. **= $p < 0.01$ entre los grupos en el CAS 2.

Además, se realizó otro experimento donde se bloqueó la actividad de los receptores AMPA en una asíntota de aprendizaje del CAS. En una quinta adquisición se realizó la microinyección del fármaco 20 minutos antes de la sacarina. En la figura 10 se puede observar el efecto de la inyección de NBQX en la ABL. Es evidente que los animales tratados bebieron mucho más líquido en comparación con los animales vehículo el día de la inyección. Este resultado sugiere, como en el experimento anterior, que la actividad de estos receptores en la amígdala basolateral es necesaria para la evocación de la memoria de aversión sin importar la fortaleza de la misma.

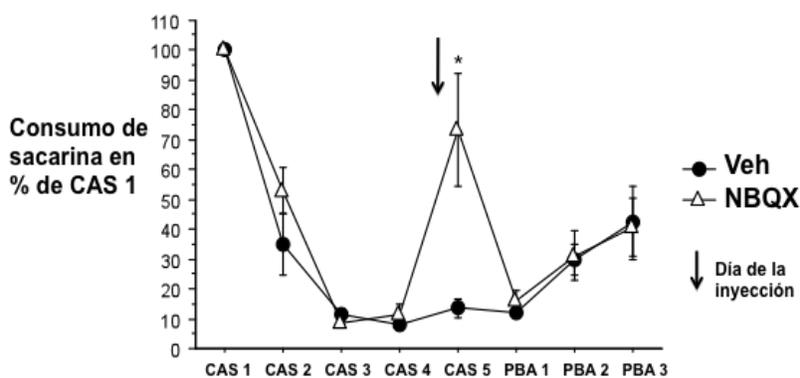


Figura 10. Bloqueo de receptores AMPA en la ABL en condiciones de asíntota de desempeño del CAS. En esta gráfica se muestra el consumo de sacarina (en % de CAS 1) a lo largo de las cinco adquisiciones (CAS 1-CAS 5) y en los días donde sólo se presentó sacarina (PBA1-PBA3). La flecha indica el día de la microinyección. Se puede observar el efecto del fármaco en la evocación de la memoria de aversión al sabor incluso cuando ya se ha llegado a una asíntota de la conducta * = $p < 0.05$ entre los grupos el día de la inyección.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Planteamiento del problema:

Dados los antecedentes descritos podemos concluir que los receptores AMPA en la amígdala basolateral son necesarios para evocar la memoria de aversión al sabor, incluso en condiciones de asíntota de desempeño conductual. Los receptores AMPA en la amígdala basolateral no son necesarios para la adquisición-consolidación de la memoria de aversión al sabor. Los procesos de adquisición-consolidación de la memoria de aversión al sabor, no dependen de evocación.

La CI y la Amígdala participan en el almacenamiento a largo plazo de la memoria gustativa de aversión al sabor a través de la síntesis de proteínas y dado que la CI participa en la incorporación de nueva información a un trazo de memoria; entonces la Amígdala y la CI son necesarias para la reconsolidación de la memoria gustativa.

Hipótesis:

La reconsolidación de la memoria de condicionamiento de aversión al sabor mediada, por la síntesis de proteínas en la Amígdala y CI, no es dependiente de su evocación.

Objetivo:

Determinar si la actualización de la memoria del condicionamiento de aversión es dependiente del proceso de evocación mediada por receptores AMPA en la amígdala basolateral y de la síntesis de proteínas en la CI y amígdala al momento de la reactivación de la memoria.

METODOLOGIA

Sujetos:

Se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de entre de entre 250 a 300 gramos al inicio del experimento, con aproximadamente 10 semanas de vida, y criadas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las cuales se mantuvieron en cajas individuales con un ciclo de luz:oscuridad 12h:12h, encendiéndose las luces a las ocho de la mañana. Las ratas fueron alojadas en cajas de acrílico donde tuvieron acceso sin restricción a comida y agua. Sólo estuvieron privadas de agua durante la fase experimental. Los procedimientos se realizaron durante la fase luminosa.

Cirugía e implantación de cánulas:

Todos los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla de ketamina (76 mg/ Kg) y xilazina (8 mg/ Kg). Empleando el procedimiento de cirugía estereotáxica estándar en la cual, una vez realizadas las trepanaciones con una fresa dental, se implantaron cánulas de 23Ga y de 12 mm de largo. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con dos tornillos y cemento dental de acuerdo a las siguientes coordenadas estereotáxicas (mm):

- 1) corteza insular, anterior 1.2, lateral \pm 5.5 y ventral 4 (Paxinos & Watson, 1986)
- 2) amígdala basolateral, posterior 2.8, lateral \pm 5, ventral 6.5. (Paxinos & Watson, 1986).

Las cánulas fueron situadas 2 mm arriba del área de interés para evitar lesiones. Al final del procedimiento se les aplicó penicilina como antibiótico; después de la cirugía a los animales se les dieron siete días para recuperarse con acceso a comida y agua sin restricción.

A todos los animales se les implantaron 4 cánulas: bilateralmente en la corteza insular y la amígdala basolateral.

Fármacos:

Se utilizó como vehículo solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). Se utilizó el inhibidor de la síntesis de proteínas anisomicina (Sigma) a una concentración de 120 mg/mL, concentración que tiene efectos en la consolidación de la memoria de aversión (Rosenblum *et al.*, 1993); se utilizó el antagonista de receptores AMPA/kainato de glutamato, NBQX (6-nitro-2,3-dioxo-1,4-dihidrobenzo [f]quinoxalina-7-sulfonamida) en una concentración de 5 mg/mL.

Inyecciones:

Se inyectó el fármaco o solución vehículo bilateralmente a través de agujas dentales introducidas en las cánulas guía y que rebasaron por 2 mm el sitio de canulación utilizando una jeringa Hamilton de 25 μ L, la cual se manejó con una bomba automática de inyección. Se inyectó 0.5 μ L por hemisferio en la amígdala basolateral y en la corteza insular 1 μ L por hemisferio durante un minuto, al terminar este tiempo se dejó el inyector dentro de la cánula un minuto adicional para permitir la completa difusión del fármaco en el tejido.

Histología:

Después de terminado el experimento se realizó la histología correspondiente para corroborar si las cánulas fueron implantadas adecuadamente. Para esto, las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital sódico (100 mg/kg), después perfundidas por vía aórtica con solución salina (0.9 %). Los cerebros

fueron extraídos y puestos en paraformaldehído (4%). Una vez que el tejido estuvo fijado fue puesto en soluciones de sacarosa del 10, 20 y 30% (24 horas en cada solución). Posteriormente los cerebros fueron cortados a 40 micras con un microtomo, teñidos con violeta de cresilo y analizados al microscopio con el fin de verificar la posición de las cánulas. Los cerebros con una implantación errónea fueron descartados del análisis estadístico.

Procedimientos conductuales

Inyección del inhibidor de la síntesis de proteínas y el NBQX durante la asíntota de desempeño:

Se privó a los animales de agua por 24 horas. Durante los siguientes tres días se les proporcionó, durante 15 minutos, 30ml de agua a cada animal a través de una probeta graduada y un tapón metálico que funcionaron como bebedero, al final se registró el consumo de agua de cada animal para calcular la tasa de consumo base (línea base). Al siguiente día se realizó el condicionamiento en el cual se proporcionó 30ml de sacarina 0.1% durante 15 minutos y se registró el consumo individual, 15 minutos después se les aplicó una inyección intraperitoneal de cloruro de litio 0.15 M (10 mL/kg). Cuatro horas después del condicionamiento se les dio a los animales 30ml de agua durante 15 minutos para evitar su deshidratación.

Los animales recibieron 4 adquisiciones con sacarina y cloruro de litio para llegar a una asíntota de desempeño de la tarea. Fueron divididos según su consumo en dos grupos e inyectados, uno con solución vehículo y anisomicina, el otro con NBQX y anisomicina, 40 minutos antes se inyectó anisomicina y 20 minutos antes de la quinta adquisición se inyectó NBQX o solución salina, según el grupo al que pertenecían. La prueba se realizó al día siguiente y consistió en la presentación de

sacarina por 15 minutos. Cuatro horas después de cada condicionamiento se dio agua por 15 minutos para evitar deshidratación.

Inyección de anisomicina y NBQX antes de la adquisición del segundo CAS:

Tres grupos de animales recibieron una adquisición del condicionamiento conductual descrito previamente y antes de la segunda adquisición fueron inyectados como sigue: un grupo con anisomicina/NBQX, otro grupo con anisomicina/solución salina y el último con vehículo/solución salina. La prueba se realizó al día siguiente y consistió en la presentación de sacarina por 15 minutos.

Análisis estadístico:

Se realizaron pruebas *t* de Student no pareadas para comparar el consumo de sacarina entre los grupos en un día determinado. Un nivel de confiabilidad < 0.05 fue aceptado como estadísticamente significativo. También se realizaron pruebas *t* de Student pareadas para comparar el consumo de sacarina entre dos días para el mismo grupo, se consideró un nivel de probabilidad < 0.05 como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

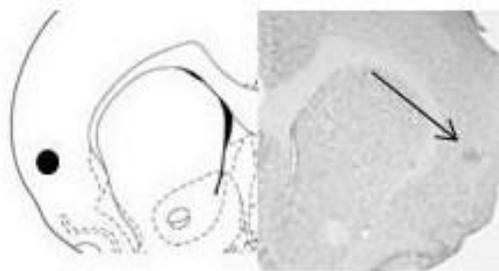
Histologías:

Se realizaron las histologías de todos los animales utilizados durante los experimentos con el fin de corroborar la correcta implantación de cánulas (figuras 11 y 12). Los animales con una cirugía errónea fueron descartados del análisis estadístico y los grupos quedaron como sigue:

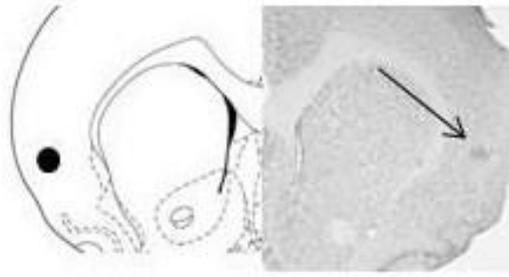
En el experimento 1 se usaron las siguientes ratas: 16 ratas en el grupo ANY/NBQX, 15 en el grupo ANY/SAL y 9 en el grupo VEH/SAL.

En el experimento 2 se usaron las siguientes ratas: 8 en el grupo ANY/NBQX y 5 en el grupo ANY/SAL.

Los análisis estadísticos se realizaron con un total de 53 ratas.



En la figura 11 podemos observar un corte coronal del cerebro de rata. En la derecha, la fotografía muestra la localización del inyector en la corteza insular (flecha). A la izquierda se muestra un esquema de la región (Paxinos y Watson, 1998).

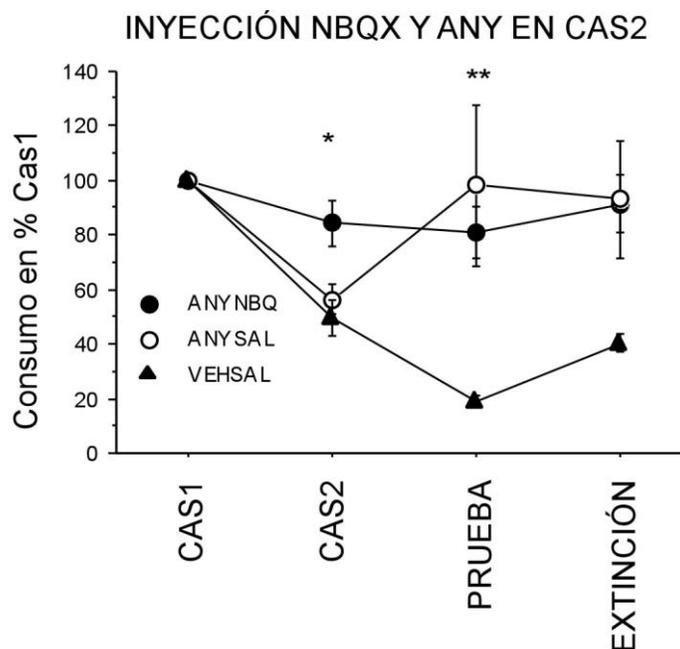


En la figura 12 podemos observar un corte coronal del cerebro de rata. En la derecha, la fotografía muestra la localización del inyector en la amígdala basolateral (flecha). A la izquierda se muestra un esquema de la región (Paxinos y Watson, 1998).

Inhibición de la síntesis de proteínas y bloqueo de receptores AMPA (Experimento 1)

Se hicieron infusiones de anisomicina en amígdala y CI y NBQX en la ABL antes de la presentación del segundo CAS para evaluar el papel de la evocación en la reconsolidación del CAS. En la figura 13 podemos observar que los animales del grupo inyectados con anisomicina y vehículo (ANY/VEH) muestran una notable deficiencia de la memoria el día de la prueba, lo cual concuerda con trabajos anteriores del laboratorio que reportan que la inhibición de síntesis de proteínas en CI y ACe afectan la reconsolidación del CAS (García-delaTorre et al. 2009). Una t no pareada mostró diferencias significativas entre el grupo ANY/VEH y el grupo control ($t_{(gl)} = 17$; $p < 0.216$). Los animales inyectados con anisomicina y NBQX (ANY/NBQX) muestran deficiencias en la evocación de la memoria el día de la segunda adquisición del CAS (día de la inyección) como lo indica una t no pareada entre grupos ($t_{(gl)} = 19$; $p < 0.0054$). Estos datos concuerdan con experimentos realizados con anterioridad en el laboratorio, que demostraron que infusiones de NBQX en la ABL impiden la evocación del CAS. Este grupo de animales también mostró incapacidad para reconsolidar la tarea el día de la prueba debido a la inhibición de la síntesis de proteínas tanto en la CI como en la amígdala. Una t no

pareada entre grupos reveló diferencias significativas ($t(g) = 20$; $p < .0001$) el día de la prueba de memoria.

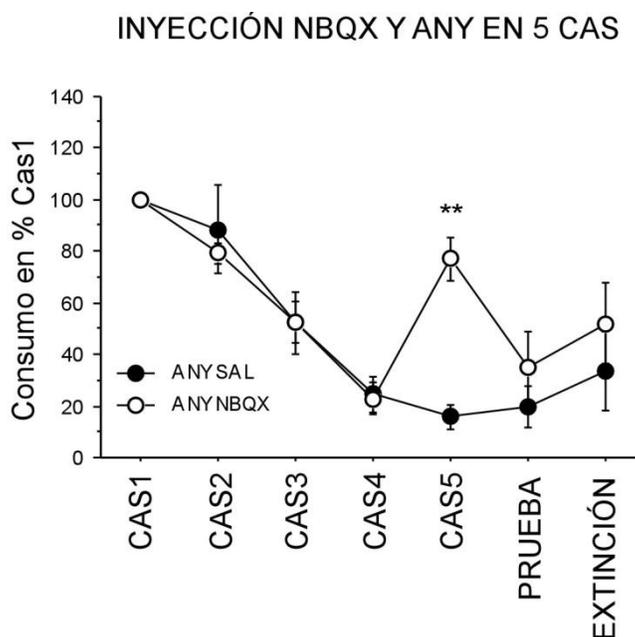


*Bloqueo de receptores AMPA en la ABL e inyección de anisomicina en CI durante la evocación del CAS. En esta figura se muestran los consumos (en % de CAS 1) de ambos grupos de las dos adquisiciones del CAS, de la prueba y la extinción. Se puede observar el efecto del fármaco NBQX en la evocación de la memoria de aversión al sabor y el efecto de la anisomicina en la adquisición o consolidación del segundo CAS. La microinyección se realizó en el CAS2. *= $p < 0.0054$ **= $p < 0.001$ entre los grupos en el CAS 2. Los grupos ANYSAL y ANY NBQX en la prueba y extinción no son diferentes entre sí con una $p > 0.05$.*

Inyección de Anisomicina y NBQX en asíntota de CAS (Experimento 2)

Dado que reportes anteriores sugieren que durante la asíntota de aprendizaje no hay reconsolidación (Rodríguez-Ortiz et al. 2005; 2008), quisimos ver si esta asíntota de aprendizaje impedía también bloquear la evocación de la memoria. Para ello se bloquearon los receptores AMPA en la ABL y se realizó la infusión de

anisomicina en la CI y amígdala en condiciones de asíntota de desempeño del CAS. En la figura 14 se puede observar el efecto del NBQX en la evocación de la memoria de aversión al sabor incluso cuando ya se ha llegado a una asíntota de la conducta, una t no pareada muestra diferencias significativas entre grupos ($t(g) = 11$; $p < .0002$) confirmando que hay un déficit en la evocación de la memoria el día de la inyección. Sin embargo, el día de la prueba y una primera extinción no se observa diferencias significativas como lo demostró una t no pareada ($t(g) = 11$; $p < .4246$).



*Bloqueo de receptores AMPA en la ABL e inyección de anisomicina en la CI en condiciones de asíntota de desempeño del CAS. En esta gráfica se muestra el consumo de sacarina (en % de CAS 1) a lo largo de las cinco adquisiciones (CAS 1-CAS 5) y en los días donde sólo se presentó sacarina (Prueba-extinción). La microinyección de los fármacos ocurrió en el CAS5. Se puede observar el efecto del fármaco en la evocación de la memoria de aversión al sabor incluso cuando ya se ha llegado a una asíntota de la conducta ** = $p < 0.05$ entre los grupos el día de la inyección, mientras que en la prueba y la extinción no se observa diferencia significativa con una $p > 0.05$ $p = 0.0002$.*

DISCUSIÓN

A lo largo del estudio de la reconsolidación de la memoria se ha considerado que la evocación juega un papel clave del proceso ya que permite que se active el trazo de memoria ya consolidado dejándolo en un estado lábil susceptible a ser modificado (Lewis, 1979; Nader et al, 2009.). También se ha propuesto que la reconsolidación es un proceso de actualización por medio del cual es posible agregar información relevante a la memoria previamente establecida (Sara, 2000; Rodríguez-Ortiz et al., 2005).

Al respecto, Lee (2008) realizó un trabajo en el cual mostró que la degradación proteínica por el proteosoma es necesaria para que la memoria del condicionamiento al miedo pueda ser reconsolidada, sugiriendo así que la síntesis de nuevas proteínas durante la reconsolidación es a su vez, dependiente de la degradación proteica. Lee utilizó el condicionamiento de miedo al contexto en el cual se asocia un choque eléctrico (EI) con un contexto (EC), por lo que al colocar de nuevo al animal en el contexto se observa una conducta de congelamiento como respuesta. Inyectó β -lac (un inhibidor del proteosoma, encargado de degradar proteínas) en el hipocampo dorsal, acompañado de anisomicina después de la evocación, como resultado observó un déficit de la reconsolidación (figura 13). Estos resultados indican que es necesaria la desestabilización (degradación de proteínas) del trazo previo de memoria y posterior estabilización (síntesis de proteínas) para reconsolidar. Es posible que esta desestabilización permita la incorporación de nueva información a un trazo ya consolidado.

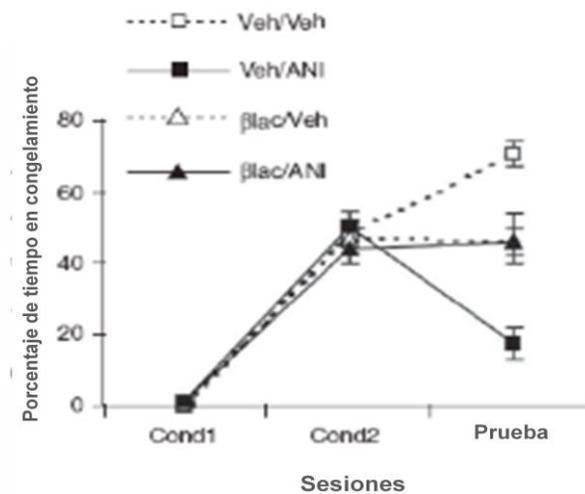


Figura 13. En esta gráfica se observa que los animales inyectados con veh/ani presentan una falta de memoria el día de la prueba ya que disminuye su conducta de congelamiento, mientras que en los vehículo se observa un incremento en el congelamiento. Sin embargo los animales que fueron inyectados con β -lac/ani o β -lac/Veh presentan la misma conducta que el día del segundo condicionamiento, manteniendo la memoria en el mismo nivel, lo anterior indica que para reconsolidar una memoria es necesaria la desestabilización por medio de degradación de proteínas (Modificado de Lee, 2008).

Los resultados observados en esta tesis concuerdan con el trabajo realizado por Yasoshima en el 2005, Yasoshima evaluó el papel de los receptores ionotrópicos AMPA en la memoria de reconocimiento de sabores por lo cual utilizaron la tarea del CAS. Después de una adquisición realizaron microinyecciones de CNQX, D-APV (antagonista de receptores NMDA) o MCPG (antagonista de los receptores de metabotrópicos de glutamato) en la ABL antes de la evocación. Las ratas que fueron inyectadas con CNQX no presentaron aversión al sabor el día de la evocación (T1) como se muestra en la figura 14. Al día siguiente (T2), los animales inyectados con CNQX presentaron una gran aversión al sabor al igual que los vehículo y los inyectados con MCPG, lo cual indica que el efecto amnésico de la droga fue temporal y reversible. Sin embargo los animales inyectados con APV muestran un déficit de memoria, un efecto en la consolidación de la memoria. Estos resultados sugieren que el bloqueo de los receptores AMPA no modifica el trazo de memoria pero si su expresión.

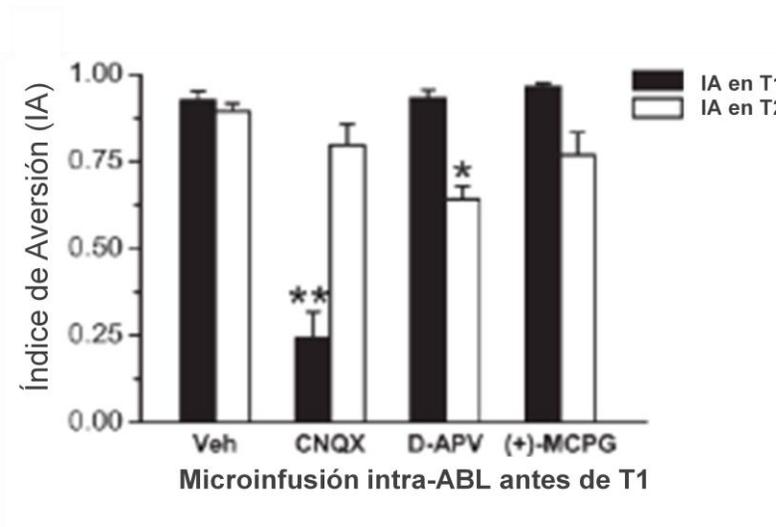


Figura 14. En esta figura se muestra el efecto de la inyección de antagonistas de tres tipos diferentes de receptores glutamatérgicos. Se graficó el consumo de sacarina representado en índice de aversión, para cada grupo durante el día 1 (T1) cuando se llevó a cabo la inyección y día 2 (T2) o día de prueba. Se observa un menor índice de aversión en el grupo inyectado con CNQX en el T1 sugiriendo que dicho fármaco afectó la evocación de la memoria de aversión, mientras que ninguno de los otros fármacos tuvo ese efecto. Sin embargo, durante el T2 sólo los inyectados con D-APV presentan un deterioro de la memoria (Modificado de Yasoshima et al; 2005).

En todos los trabajos antes mencionados, la evocación parece ser el proceso que permite que el trazo previo pueda ser reconsolidado. En este trabajo se evaluó el papel de la evocación en la reconsolidación de la memoria en un condicionamiento de aversión al sabor, esto se realizó mediante el bloqueo de receptores AMPA en la ABL ya que se sabe que estos receptores son necesarios para que haya evocación de la memoria (Berman et al., 2000; Yasoshima et al., 2005), además se inhibió la síntesis de proteínas en la CI y ACe ya que sabemos por estudios previos que es necesario afectar a ambas estructuras para que no ocurra la reconsolidación.

En este trabajo pudimos observar que al inyectar NBQX en la amígdala se afecta la evocación de la memoria pero no la adquisición o consolidación de la misma corroborando los datos de Berman (2000) y Yasoshima (2005). Cuando además se inyectó anisomicina en la CI y amígdala conjuntamente, antes de la segunda presentación del CAS, se afecta no sólo la evocación de la memoria, pero también la reconsolidación de la misma. En este experimento, el día de la inyección, los animales beben una cantidad de sacarina similar al primer día reflejando un déficit en la evocación, sin embargo beben significativamente menos volumen de sacarina que los animales vehículo el día de la prueba, lo cual indica que también se afectó la reconsolidación. Sin embargo, los animales que solo fueron inyectados con anisomicina se comportan de la misma manera que los animales vehículo el día de la inyección pero no así el día de la prueba en donde demuestran un déficit en la reconsolidación de la tarea. En conjunto, estos resultados nos llevan a pensar que la evocación no es necesaria para iniciar el proceso de la reconsolidación y que además, se trata de dos procesos independientes (Experimento 1).

Recientemente, se han presentado pruebas de que la reconsolidación es un mecanismo que permite la incorporación de información a un trazo previamente consolidado (Rodríguez-Ortiz, 2005 y 2008; Lee, 2008). En estos experimentos se sugiere que siempre que exista información relevante para introducir a un trazo de memoria previamente consolidado, la inhibición de la síntesis de proteínas es capaz de irrumpir la memoria almacenada; es decir la reconsolidación. Por ello, cuando el desempeño de una tarea llega a un nivel asintótico, la inhibición de la síntesis de proteínas no afecta la memoria. Basado en estos datos, quisimos evaluar si cuando el CAS ha llegado a un comportamiento asintótico, la doble inyección (NBQX y anisomicina) podía afectar la reconsolidación y/o evocación del CAS (Experimento 2). Los resultados que obtuvimos coinciden con la teoría de la actualización de la memoria ya que no pudimos afectar la memoria en una quinta adquisición del CAS. Además pudimos observar que el bloqueo de los

receptores AMPA sí impiden la evocación conductual de la memoria independientemente del nivel de aprendizaje.

Una explicación para los datos anteriores es que el efecto conductual del bloqueo de receptores AMPA (inhibición de la evocación) no impida que el trazo de memoria sea activado por otros medios que no permiten la expresión conductual de la evocación. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, la evocación no es un paso necesario para que se lleve a cabo la reconsolidación, lo indispensable es en cambio, la presentación de información relevante al trazo que será incorporada.

Otra posibilidad es que al afectar a los receptores AMPA se esté afectando la homeostasis del sistema y eso ocasione el déficit en la evocación. La plasticidad homeostática se refiere a aquellos cambios que estabilizan la actividad neuronal ante otros cambios, como el número de sinapsis o la fuerza de las conexiones, que finalmente modifican su excitabilidad (Nelson y Turrigiano-,2008). Este proceso de plasticidad homeostática puede llevarse a cabo mediante escalamiento sináptico, que implica la inserción o remoción de receptores AMPA en la membrana postsináptica para compensar periodos de fuerte actividad o largos periodos de inactividad, pero manteniendo constantes los pesos relativos que fueron establecidos por procesos plásticos anteriores de tipo hebbiano (que se refieren a modificaciones sinápticas a largo plazo, ya sea fortalecimiento o debilitamiento, que requieren de la correlación entre disparos pre y post-sinápticos, por lo cual son específicos e independientes a cada conexión (Abbott y Nelson, 2000). Estudios recientes han demostrado que el bloqueo con TTX y CNQX que reducen de manera indirecta la activación de los receptores AMPA, pueden producir escalamiento sináptico.

De acuerdo a estos datos, podríamos estar interrumpiendo la homeostasis sináptica a nivel del escalamiento sináptico de los receptores AMPA y de esta

manera podemos evitar la expresión de la conducta, pero no así la capacidad de las redes sinápticas para poder reconsolidar.

Los resultados de esta tesis concuerdan con datos obtenidos anteriormente en nuestro grupo de trabajo que demuestran que la CI y la ACe son las estructuras que participan en la reconsolidación de la memoria de aversión al sabor (García-DeLaTorre et al. 2009). En estos experimentos se realizaron dos adquisiciones del CAS y la inyección de anisomicina se realizó antes del segundo CAS, la infusión del fármaco se realizó en tres estructuras diferentes: CI, ABL y ACE. El día de la prueba de memoria se observó que los animales que fueron inyectados en la CI o en la Ace no consolidaron la memoria, mientras que los animales inyectados en la CI y ACE de manera simultánea no reconsolidaron ya que el trazo anterior se vio afectado. Sin embargo, inyecciones simultáneas de anisomicina en la CI y ABL tienen el mismo efecto que cuando sólo se afecta la CI. Por estos datos podemos descartar un efecto secundario por el volumen inyectado y asegurar que la conducta que observamos es debido al bloqueo de los receptores AMPA o a la inhibición de la síntesis de proteínas.

Quizás, el dato más relevante de esta tesis es que la inhibición de los receptores AMPA a través de la droga NBQX impide la expresión de la evocación conductual pero no interrumpe el proceso de reconsolidación de una memoria, en este caso del CAS. Nuestros resultados coinciden con los resultados del grupo de Ben Mamou en el 2006 donde demostró que en la memoria del condicionamiento al miedo, los receptores AMPA en la ABL no son necesarios para su reconsolidación. En éste último trabajo (Ben-Mamou *et al.*, 2006) se realizaron experimentos con la finalidad de evaluar la participación de los receptores AMPA en la evocación de la memoria del condicionamiento auditivo del miedo en ratas. En este condicionamiento se aparea un tono (EC) con un choque eléctrico (EI). El apareamiento se realizó el día uno y en el día dos se realizó una sesión de

reactivación, que consistió en presentar únicamente el EC. Durante este día se realizaron microinyecciones del antagonista de receptores AMPA, CNQX, antes de la presentación del EC y posteriormente la de anisomicina, o bien la de sus respectivos vehículos. Se realizó una prueba para evaluar la memoria de corto plazo 4 horas después de la reactivación (PR-MCP) y una para la de largo plazo 24 horas después (PR-MLP).

El grupo de animales que recibió el tratamiento de CNQX presentó una conducta normal de congelamiento en las pruebas de corto y largo plazo pero un congelamiento menor el día de la inyección. Los animales con tratamiento de CNQX y anisomicina presentaron un menor porcentaje de congelamiento el día de la prueba de MLP pero un déficit en la evocación . Lo anterior indica que el bloqueo de receptores AMPA no impide que ocurra la reconsolidación de la memoria pero sí que sea evocada. Para poder afectar la reconsolidación es necesario inhibir la síntesis de proteínas al igual que para el CAS como pudimos demostrar en esta tesis.

.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de esta tesis demostraron que los receptores AMPA son esenciales para la evocación de la memoria de aversión a los sabores pero no así para su reconsolidación. Estos resultados proporcionan evidencia de una posible disociación molecular de los mecanismos que controlan y regulan el proceso de reconsolidación y evocación de una memoria. Sabemos que la ABL es la responsable de la evocación pero no de la consolidación o reconsolidación del CAS que a su vez está a cargo de la ACe y de la CI.

De momento no conocemos la razón de dicha disociación de eventos y es necesario realizar más estudios para conocer los disparadores del proceso de reconsolidación tanto a nivel conductual como a nivel molecular.

Nuestros datos coinciden con los de Ben Mamou en cuanto a que la reconsolidación no depende de evocación, además nosotros pudimos demostrar que tampoco es necesaria durante la actualización del trazo.

LITERATURA CITADA

Abbot, L.F. y Nelson, S.B. (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nature Neuroscience*, 3, 1178-1183.

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

Barondes, S.H; Cohen, H.D. (1967) Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory on mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58(1):157-64

Bermúdez-Rattoni F. (2004) Molecular Mechanisms of Taste - Recognition Memory. *Nature Neuroscience Reviews* 5 p. 209 -217.

Bermudez-Rattoni F, Ramirez-Lugo L, Gutierrez R, Miranda MI (2004) Molecular signals into the insular cortex and amygdala during aversive gustatory memory formation. *Cellular and Molecular Neurobiology* 24:25-36.

Bermúdez-Rattoni F. (2007). *Neural Plasticity and Memory, from genes to brain imaging*. Estados Unidos. *Frontiers in Neuroscience* (157-173).

Bermúdez-Rattoni F. y Prado Alcala. R.. (2001) *Memoria, donde reside y cómo se forma*. México: Trillas (11-36).

Bernstein I. L. y Koh M. T. (2007) Molecular Signaling during Taste Aversion Learning. *Chem Senses* 32, 99-103

Bures, J. Bermudez-Rattoni, F. y Yamamoto, (1998) T. Editors, *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*, Oxford University Press, New York.

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

Davis, M, Rainnie, D. y Cassel, M. (1994) Neurotransmission in the rat amygdal related to fear and anxiety. *TINS* 17: 208-214.

Debiec, J., LeDoux, J.E., and Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, 527-538.

Desmedt, A., Hazvi, S., and Dudai, Y. (2003). Differential pattern of cAMP response element-binding protein activation in the rat brain after conditioned aversion as a function of the associative process engaged: taste versus context association. *J Neurosci* 23, 6102-6110.

Dudai, Y. (1993) A Cellular Mnemonic device in the mammalian brain: long-term potentiation. *The Neurobiology of memory, concepts, findings, trends.* Yadin Dudai Eds N.Y. Oxford University. 88-105

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

Duncan, CP, (1949) The retroactive effect of electroconvulsive shock. *J. Comp Physiol. Psychol.*42: 32-44.

Ferreira, G., Gutierrez, R., De La Cruz, V., and Bermudez-Rattoni, F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci* 16, 1139-1145.

Flexner, J.B., Flexner, L.B., Stellar, E., De La Haba, G., and Roberts, R.B. (1962). Inhibition of protein synthesis in brain and learning and memory following puromycin. *J Neurochem* 9, 595-605.

Fonseca, R., Nagerl, U. V. & Bonhoeffer, T. (2006) Neuronal activity determines the protein synthesis dependence of long-term potentiation. *Nature Neurosci.* 9, 478-480.

García-DeLaTorre P, Rodríguez-Ortiz CJ, Arreguin-Martínez JL, Cruz-Castañeda P, Bermúdez-Rattoni F. (2009) Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn Mem.* 2009 16(9):514-9.

Hupbach, A., Gomez, R., Hardt, O., and Nadel, L. (2007). Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* 14, 47-53.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H & Jessell, T.M. eds. *Principles of neural science.* New York: Mac Graw-Hill Health division: 1227-1246.

Kesner, P. & Rogers, J. (2004) An analysis of independence and interactions of brain substrates that subserve multiple attributes, memory systems and underlying processes. *Neurobiology of Learning and Memory* 82: 199-215.

LeDoux, J. E. (1993) Emotional memory system in the brain. *Behavioral Brain Research* 58: 69-79.

Lee, J, L, C. (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, Vol. 11: 1264-1266.

Lee, S,H; Choi, J, H; Lee, N; Lee, H, R; Kim J, I; Yu, N, K; Choi, S, L; Lee, S,H; Kim, H; Kaang, B, K. (2008) Synaptic Protein Degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319: 1253 - 1256.

Lewis, D. J. (1979) Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.* 86, 1054-1083.

Martin, S.J., Grimwood, P.D., and Morris, R.G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23, 649-711.

Martinez, J. L., Jr., y Kesner, R. P. (Eds.) (1998). *Neurobiology of learning and memory*. San Diego, CA: Academic.

McDonald, A.J. (1998) Cortical pathway ton the mammalian amygdale. *Prog, Brain Res.* 55: 257-332.

McGaugh, J.L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248-251.

McGaugh JL. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci.* 27:1-28.

Misanin, J. R., Miller, R. R. y Lewis, D. J. (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160: 203-204.

Morris, R.G., Inghis, J., Ainge, J.A., Olverman, H.J., Tulloch, J. y Dudai, Y. (2006) Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*, 50: 479-489.

Nader, K. y Oliver, H. (2009) A single standar for memory: the case for reconsolidation Revs, *Nature* 224-234.

Nader, K. Schafe G. E; Ledoux J. (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after its reactivation. *Nature* 406: 722-726.

Nader, K. (2003) Memory traces unbound. *Opinion Trends in Neurosciences* Feb; 26(2): 65-72.

Nelson, S.B. y Turrigiano, G.G. (2008). Strength through Diversity. *Neuron*, 60, 477-482.

Purves, D; Augustine, George J; Pitzpatrick, David; Hall, William C; Lamantia, Anthony S; McNamara, James O; Williams, S. Mark (Eds.) (2003). *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc.; Sunderland, MA.

Rodriguez-Ortiz, C.J; Garcia-DeLaTorre, P; Benavidez, E; Ballesteros, M.A; Bermudez-Rattoni, F. (2008) Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiology of Memory* 89: 352-359.

Rodriguez-Ortiz, C.J., De la Cruz V., Gutierrez, R., Bermudez Rattoni, F. (2005) Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained, *Learning and Memory*., 12 (5):533-537.

Rosenblum, K., Meiri, N., and Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59, 49-56.

Sara, S.J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7, 73-84.

Siegel, G; Albers, R. W.; Brady, S; Price, D; (eds.); (1999). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed; American Society for Neurochemistry, USA.

Spear, N. E. y Gordon, W. C. (1973) Effect of reactivation of a previously acquired memory on the interaction between memories in the rat. *J. Exp. Psychol.* 99, 349-355.

Spray, J.K. y Bernstein, I.L. (2004) Afferent and efferent connections of the parvicellular subdivision of NTS: defining a circuit involved in taste aversion learning. *Behavioral Brain Research* 154: 85-97.

Stekalova, T., Zomer, B. Zacher, C., Sadovska, G., Herdegen, T. y Gras, P. (2003) Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes Brain Behav.* 2: 3-10.

Swanson, L.W. (1992) *Brain maps: Structure of the rat brain*. New York Elsevier.

Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B., and Alberini, C.M. (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4, 813-818.

Tronson, N.C. & Taylor, J.R. (2007) Molecular Mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci.* (4): 262-275.

Wright, C. I. Beijer, A. V., y Growenegen, H.J. (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci.* 16 (5): 1877-1893.

Yamamoto T, Matsuo R, Fujimoto Y, Fukunaga I, Miyasaka A, Imoto T. (1991) Electrophysiological and behavioral studies on the taste of umami substances in the rat. *Physiol Behav.* 49(5):919-25.

Yamamoto,T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y y Kitamura, R. (1989) Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *J. Neurophysiol.* 61: 1244- 1258.

Yamamoto, T. (2007). Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats. *Chem Senses* 32, 105-109.

Yamamoto, T; Nagai, T; Shimura, T; Yasoshima, Y. (1997) Roles of chemical mediators in the taste system. *Japanese Journal of Pharmacology* 76, 325-348.

Yasoshima, Y; Yamamoto, T; Kobayashi, K. (2005) Amygdala-dependent Mechanisms Underlying Memory Retrieval of Conditioned Taste Aversion. *Chemical Senses* 30: 158-159.