



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA CINASA M ZETA (PKMZ) EN LA
INTERACCIÓN METAPLÁSTICA DEL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO A LOS
SABORES (CAS) Y LA POTENCIACIÓN DE LARGO PLAZO (LTP) EN LA
CORTEZA INSULAR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

SANDYBEL ÁNGELES DURÁN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ

REVISOR: JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Empezaré agradeciendo y dedicando este trabajo mi familia. Mamá te agradezco todo el esfuerzo que has hecho y todo el apoyo que me has dado a lo largo de mi vida. Papá, gracias por todos esos sacrificios que tuviste que hacer para que lograra tantas cosas. A mis hermanos, Lendy y Erik porque a pesar de todo, se que ustedes siempre estarán ahí cuando los necesite.

A Martha Escobar, a quien respeto, admiro y aprecio. Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y por dejarme trabajar ahí haciendo lo que más me gusta. Gracias por todo el apoyo que me has brindado en estos años. Agradezco profundamente todo el tiempo que has invertido en la dirección y corrección de mi tesis. Gracias por la confianza y por todas las palabras de ánimo. Gracias por compartir de manera extraordinaria todo el conocimiento que posees.

Gracias a mis compañeros del laboratorio: Diana, Minerva, Luis. Quienes me apoyaron cuando llegué al laboratorio y pacientemente me enseñaron muchas cosas. Quiero agradecerle principalmente a Andrea Gómez-Palacio Schjetnan por introducirme al mundo de las neurociencias, además por ser una gran amiga que me ha apoyado y motivado constantemente, eres mi ejemplo a seguir!

El codón merece un párrafo aparte. Laurita y Andreita, gracias por todo!!!! Por la convivencia, el apoyo, por todos los consejos, por estar ahí siempre que las necesito, gracias por motivarme. Recuerdo con singular alegría todas esas cosas que hemos vivido juntas (especialmente el congreso de ciencias fisiológicas). Gracias por ser mis amigas.

A mi Carlos, por todos los momentos que hemos pasado juntos. Ocupas un lugar muy importante en mi vida. Gracias por motivarme a ser una mejor persona. Todas tus palabras de ánimo han sido muy significativas para mí. Te amo.

A mis amigas: Maribel, Isa, Aldonza, Ivette, cada vez que me acuerdo de todas nuestras pláticas me río. Gracias a todas esas pláticas siempre tan interesantes, por aminorar todo el estrés de la carrera y sustituirla por risas.

Gracias a Irma Romero y Mario Schjetnan por darme siempre su apoyo y motivación. Irmita gracias por escucharme, por apoyarme y por recordarme siempre que hay muchos objetivos que deben ser cumplidos y que no debo rendirme tan fácilmente.

A mi revisor Fernando Peña y a mis sinodales Eduardo Calixto, Víctor Ramírez Amaya y Cesar Casasola por contribuir a la mejora de este trabajo.

Por último agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque me ha dado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y por darme la oportunidad de dedicarme a lo que me apasiona.

ÍNDICE

1	Introducción.....	6
2	Antecedentes.....	6
2.1	Potenciación de largo plazo.....	7
2.1.1	Características generales de la LTP.....	9
2.1.2	Mecanismos moleculares de la LTP	10
2.1.3	LTP en la neocorteza.....	12
2.1.4	LTP y conducta	13
2.2	Plasticidad homeostática.....	14
2.2.1	Metaplasticidad y escalamiento sináptico.....	15
2.2.2	Metaplasticidad y conducta en la neocorteza	19
2.3	Condicionamiento aversivo a los sabores	21
2.3.1	Corteza insular, la vía gustativa y el CAS.....	23
2.3.2	Corteza insular, LTP y CAS.....	25
2.4	Proteína cinasa M zeta (PKM ζ).....	26
2.4.1	Proteína cinasa M zeta y la LTP.....	29
2.4.2	Proteína cinasa M zeta y conducta	31
2.4.3	Proteína cinasa M zeta y la neocorteza	33
3	Planteamiento del problema y justificación.....	34
4	Objetivos.....	35
5	Procedimiento experimental.....	35
5.1	Sujetos.....	35
5.2	Diseño experimental.....	36
5.3	Implantación de cánulas.....	39
5.4	CAS.....	40
5.5	Electrofisiología.....	41
5.6	Análisis histológico de Nisl.....	42
5.7	Análisis de datos.....	43
6	Resultados fase 1.....	43
6.1	Conductuales.....	43
7	Resultados fase 2	45
7.1	Conductuales.....	45
7.2	Electrofisiológicos.....	47
8	Resultados histológicos	53
9	Discusión y conclusiones.....	55
10	Referencias.....	65

Resumen

La neurociencia cognitiva define al aprendizaje como el mecanismo a través del cual se adquiere información acerca del mundo, en tanto, la memoria es el mecanismo por el cual la información adquirida es almacenada. La potenciación de largo plazo (LTP) es un fenómeno celular que ha contribuido de manera significativa al estudio de los procesos mnémicos y es definida como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación de las fibras aferentes a un área determinada del sistema nervioso. La LTP fue inicialmente descrita en el hipocampo, una estructura implicada en diversas formas de aprendizaje y memoria; actualmente se sabe que la LTP puede ser inducida en diversas áreas cerebrales, entre las que se encuentra la neocorteza, considerada como el almacén de la memoria de largo plazo. Entre las áreas neocorticales donde se ha observado la inducción de la LTP se encuentra la corteza insular (CI), específicamente la vía que va del núcleo basolateral amigdalino (BLa) a la zona agranular de la CI. La CI es una región de la corteza temporal implicada en la adquisición y almacenamiento del paradigma de aprendizaje denominado condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), en este modelo conductual un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo novedoso cuando éste se asocia con una irritación gástrica. Investigaciones recientes señalan a la proteína cinasa M zeta (PKM ζ) como una importante proteína asociada con el almacenamiento de información por periodos prolongados. La PKM ζ es miembro de la familia de las proteínas cinasas C (PKCs), la característica que distingue a esta proteína es su estructura, ya que está formada por un dominio catalítico que carece de un dominio regulatorio, por esta razón, los segundos mensajeros que activan a PKC no son requeridos para estimular a PKM ζ , de manera que una vez sintetizada, PKM ζ se encuentra en un estado activo. Recientemente se ha observado que PKM ζ está involucrada en la permanencia de fenómenos plásticos como la LTP, y que su actividad en la corteza insular es necesaria para el mantenimiento de la memoria gustativa de largo plazo. Hoy en día existen numerosas evidencias experimentales que muestran que la historia de actividad de una neurona o vía de conexión puede modificar la manera en que ésta presentará una subsecuente plasticidad sináptica. Estas modificaciones forman parte de una serie de mecanismos reguladores denominados plasticidad homeostática, que le permiten al sistema mantenerse en un rango funcional de actividad. Entre las expresiones de plasticidad homeostática se encuentra la metaplasticidad, definida como un cambio en la posibilidad para inducir subsecuente plasticidad sináptica. En nuestros estudios previos se reportó que la inducción de LTP en la vía BLa-CI antes del CAS aumenta la retención de dicho aprendizaje. Aunado a lo anterior, nuestras investigaciones recientes muestran que el entrenamiento en el CAS bloquea la posibilidad de inducir subsecuente LTP en la vía BLa-CI, y esta inhibición persiste hasta 120 horas después del entrenamiento. Lo anterior sugiere que la conducta produce cambios en las propiedades neuronales capaces de modificar la subsecuente expresión de plasticidad sináptica a manera de expresión metaplástica. Considerando lo anterior, el objetivo del presente estudio fue analizar la participación de la proteína cinasa M zeta en la modulación que ejerce el CAS sobre la subsecuente inducción de la LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular de ratas adultas *in vivo*. En el presente estudio se utilizaron 28 ratas macho de la

cepa Wistar, con pesos entre 360 y 380 g. Los animales fueron implantados bilateralmente con guías cánulas dirigidas hacia la CI con un periodo de recuperación postoperatorio de una semana. El presente proyecto se dividió en las siguientes fases experimentales: Fase 1, en el grupo CAS+ZIP las ratas fueron entrenadas en el CAS, 72 horas después de la sesión de adquisición de este condicionamiento recibió una microinfusión intracortical del inhibidor selectivo de PKM ζ (ZIP/10nM/1 μ l/1min/hemisferio) y siete días más tarde se realizó la prueba de aversión; el grupo CAS+VEH, fue entrenado de manera similar al grupo CAS+ZIP, pero fue microinfundido con PBS como vehículo de ZIP. Fase 2: el grupo CAS+ZIP+LTP, el cual fue entrenado en el CAS y 72 horas después de la sesión de adquisición de este condicionamiento recibió una microinfusión intracortical del inhibidor selectivo de PKM ζ (ZIP/10nM/1 μ l/1min/hemisferio) y 48 horas más tarde fue introducido a la fase electrofisiológica; el grupo CAS+VEH+LTP, el cual recibió el mismo tratamiento que el grupo CAS+ZIP+LTP, pero en presencia de PBS como vehículo de ZIP (1 μ l/1min/hemisferio); grupo PA+ZIP+LTP, el cual recibió el mismo tratamiento que el grupo CAS+ZIP+LTP, y adicionalmente fue sometido a una prueba de aversión (PA) 48 horas después de la sesión de adquisición, con el fin de comprobar que las ratas asociaran el estímulo gustativo con el malestar gástrico; grupo LTP, a este grupo se le indujo LTP sin ninguna manipulación previa y grupo CAS, fue entrenado en el CAS de manera habitual. Nuestros resultados demuestran que el entrenamiento en el CAS produce un efecto metaplástico en la vía BLA-CI, el cual se manifiesta como un bloqueo en la posibilidad de inducir LTP en dicha vía. Asimismo, mostramos que la inhibición de PKM ζ en la CI impide el almacenamiento de la memoria de largo plazo del CAS, permitiendo la subsecuente inducción de LTP en la proyección BLA-CI. En conclusión, los datos anteriores sugieren que PKM ζ es una proteína necesaria para la prevalencia de fenómenos metaplásticos, los cuales son esenciales para que el sistema nervioso mantenga un estado de homeostasis, preservando su capacidad para almacenar información.

1. INTRODUCCIÓN

Las experiencias nos cambian; afrontar nuestro entorno altera nuestra conducta, al modificar nuestro sistema nervioso. La neurociencia cognitiva se deriva de la confluencia de dos disciplinas: la psicología y la neurobiología, originando una aproximación multidisciplinaria que concibe a los procesos cognitivos como el resultado de la comunicación neuronal en el interior del sistema nervioso. Desde dicho enfoque, el aprendizaje es definido como el mecanismo a través del cual se adquiere información acerca del mundo, en tanto, la memoria es el mecanismo por el cual la información adquirida es almacenada (Bear et al, 2001; Kandel et al, 2001).

La memoria se ha estudiado desde diferentes perspectivas y ha sido clasificada en diferentes categorías. Según Baddeley, éste proceso puede ser dividido en: adquisición, consolidación y evocación, de acuerdo con las etapas de dicho proceso. Por su temporalidad, Atkinson y Shiffrin la dividieron en corto y largo plazo, mientras que por el tipo de información que se almacena, Tulving y Squire propusieron que la memoria se puede clasificar en declarativa o explícita (hechos y eventos) y no declarativa o implícita (habilidades y hábitos motores) (Baddeley, 1983).

La capacidad de almacenamiento es lo que le permite al organismo adaptarse y comportarse de manera exitosa en su entorno. La formación de un trazo mnémico es dependiente de cambios en la transmisión sináptica que permiten el fortalecimiento de las redes neuronales.

Los mecanismos que subyacen al incremento en la eficiencia sináptica durante periodos prolongados tienen especial relevancia para el estudio de memoria, debido a que representan expresiones de plasticidad sináptica de largo plazo.

2. ANTECEDENTES

Actualmente se conoce la participación de distintas regiones del cerebro involucradas en el aprendizaje y la memoria, entre ellas se encuentran el cerebelo, los lóbulos temporales, la neocorteza y la formación hipocampal

(Bear et al., 2001). Así mismo se sabe que la memoria se refleja en la capacidad de las neuronas para modular las respuestas evocadas por un estímulo y para reactivar una respuesta en ausencia del estímulo que la originó (Eichenbaum, 1997). Evidencias experimentales indican que el mantenimiento de trazos de memoria durante periodos prolongados puede incluir la persistente actividad de algunas moléculas, promoviendo la formación y mantenimiento de la memoria de largo plazo (Shema et al., 2007; Shema et al., 2009).

2.1 Potenciación de largo plazo

Los mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica se han relacionado con cambios en la eficiencia sináptica, que perduran por semanas, meses e incluso años; estos cambios se han propuesto como explicaciones potenciales del almacenamiento de la información. En 1894, Santiago Ramón y Cajal propuso que la memoria era almacenada a través de cambios morfológicos y funcionales en la comunicación neuronal. En 1949 Donald Hebb postuló que cuando “el axón de una célula A está suficientemente cerca para excitar a una célula B y repetida o persistentemente toma parte de su activación, algún cambio de proceso de crecimiento o cambio metabólico tiene lugar en alguna de las dos células, de modo que la eficacia en A para activar a B incrementa” (Hebb, 1949). Actualmente conocemos un fenómeno que puede explicar éstas modificaciones plásticas del sistema nervioso. La potenciación de largo plazo (LTP por sus siglas en inglés) es el principal modelo experimental usado para estudiar los cambios asociados a la experiencia, el cual ha ayudado a vislumbrar la naturaleza de los procesos mnémicos.

Bliss y Lømo en 1973 describieron que trenes breves de estimulación aplicados en la vía que va del patrón perforante al giro dentado en el hipocampo de los conejos, causan un incremento en la fortaleza de las conexiones sinápticas, como se aprecia en la figura 1 (Bliss y Lømo, 1973). Desde su descubrimiento, la LTP de la transmisión sináptica excitatoria del hipocampo, se ha convertido en la principal herramienta usada para examinar los mecanismos de almacenamiento de la información. Actualmente se define a la LTP como “el incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación de

las fibras aferentes a un área determinada del sistema nervioso”. Se considera que el postulado de Hebb se ve representado en dicho fenómeno (Bear et al, 2001). Inicialmente la LTP fue reportada en el hipocampo, desde entonces se ha encontrado que dicho fenómeno no es particular de una vía ni tampoco de una sola área del sistema nervioso central; por ejemplo, en el hipocampo además del patrón perforante (Bliss y Lømo,1973) el fenómeno se ha reportado en las colaterales de Schaffer (Wang y Steltzer,1996; Abraham y Hugett,1997) y en las fibras musgosas (Derrik et al.,1991; Nicoll y Malenka, 1995; Escobar et al.,1997). Entre las áreas no hipocampales donde se ha reportado la expresión de la LTP se encuentran las siguientes vías: Tálamo auditivo-amígdala (Clugnet et al., 1990), fibras paralelas-neuronas de purkinje en el cerebelo (Losi et al., 2002), cortico-estriado (Calabresi et al., 2000), y varias regiones de la neocorteza (Artola y Singer, 1990; Tsumoto, 1992; Bear y Kirkwood, 1993; Escobar et al; 1998a).

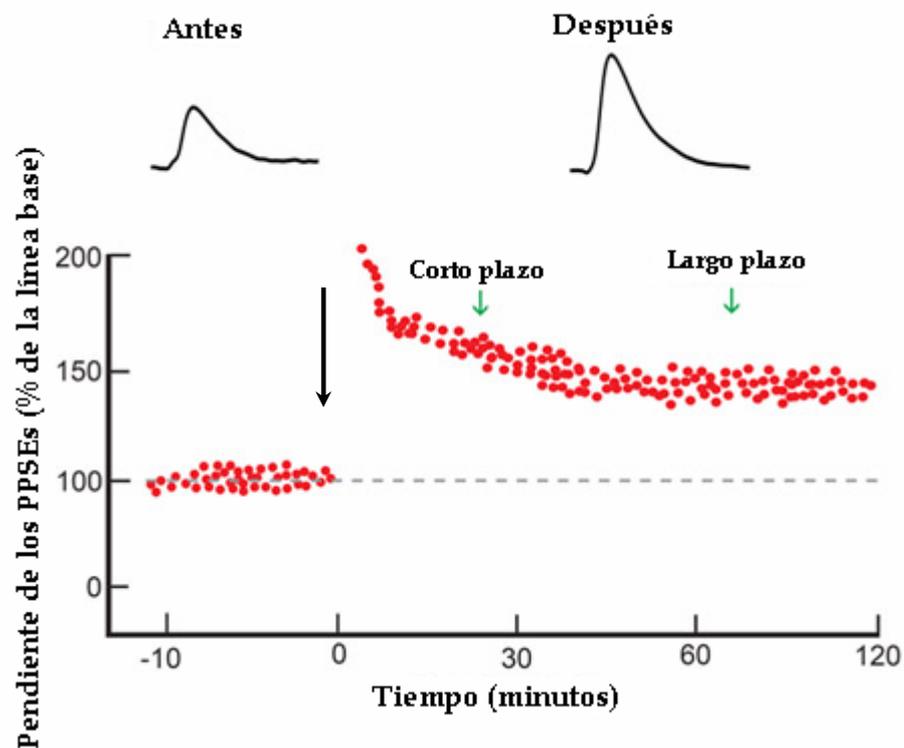


Figura 1. Potenciación de largo plazo. La gráfica muestra la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) del área CA1 hipocámpal antes y después de la aplicación de trenes de alta frecuencia (flecha) en el área CA3 del hipocampo. Los trazos superiores muestran un incremento en la amplitud de los PPSEs después de la inducción de la LTP (Modificado de Thompson et al., 2005).

Se considera que la LTP es el reflejo de los procesos celulares que ocurren durante la transmisión sináptica normal y que subyace a los cambios sinápticos durante la formación de la memoria. Es claro que la LTP puede presentarse en muchas sinapsis del sistema nervioso. Mientras que numerosas formas de LTP involucran la activación de los receptores NMDA, no siempre son requeridos (Escobar et al., 1997). Además, los mecanismos implicados en la inducción de la LTP difieren en función a la estructura cerebral estimulada. Por lo tanto, se considera que la potenciación de largo plazo de la transmisión sináptica excitatoria es una propiedad intrínseca de las redes neuronales, que utilizan distintos mecanismos de inducción y posiblemente de expresión en diferentes poblaciones sinápticas (Escobar y Derrick, 2007).

2.1.1. Características generales de la LTP

Además de su persistencia en el tiempo, la LTP posee características que la convierten en el principal fenómeno para explicar los eventos que a nivel celular, y molecular, subyace a la plasticidad sináptica relacionada con la memoria. Estas características son: la *especificidad*, la *cooperatividad* y la *asociatividad* (Bailey et al., 2000) (Figura 2). La *especificidad* se refiere a que solamente aquellas fibras que fueron activadas por el estímulo de alta frecuencia van a presentar modificaciones en la respuesta sináptica. La *cooperatividad* se manifiesta por un fuerte requerimiento en la actividad simultánea de las fibras presinápticas, de tal forma que se logre el estímulo necesario para activar la LTP. Finalmente, la *asociatividad* que se observa cuando la actividad de una aferencia lo suficientemente fuerte como para presentar LTP, puede ayudar a generar el fenómeno en sinapsis débiles (incapaces de generar LTP por si mismas), siempre y cuando la actividad de las dos aferencias ocurra simultáneamente (Malenka y Nicoll, 1993). La relación de este fenómeno con el procesamiento de información ha sido extensamente estudiada en el hipocampo y otras regiones del SNC. Algunos de los puntos que hacen pensar a los investigadores que la LTP y los procesos de aprendizaje y memoria son similares son: que la LTP puede operar en las redes de neuronas que se han visto involucradas con procesos de aprendizaje y memoria (hipocampo, amígdala, neocorteza etc.), dura un lapso prolongado

de tiempo y funciona de manera similar al postulado de Hebb (Martínez y Derrik, 1996).

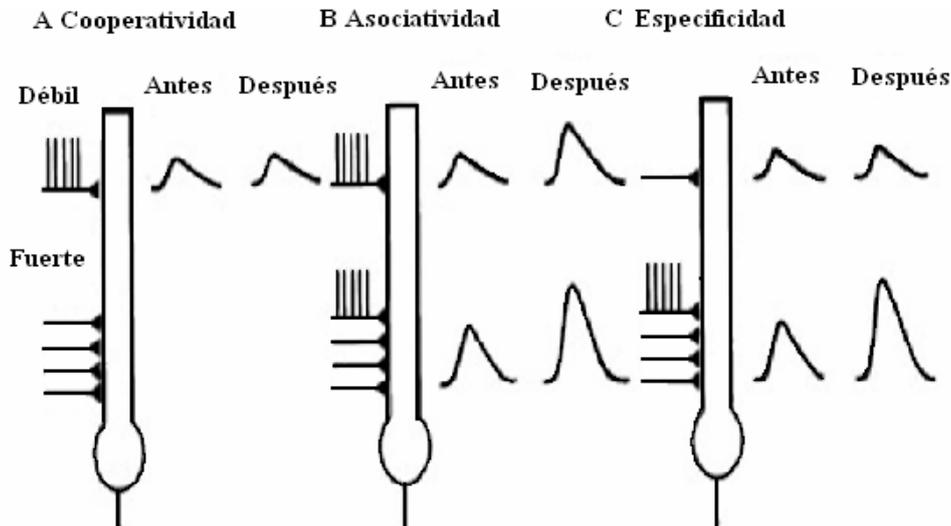


Figura 2. Características de la potenciación a largo plazo. Esquema representativo de las características de la LTP. (Modificado de Feldman y Quenzer, 1984).

2.1.2 Mecanismos moleculares de la LTP

Entre los mecanismos bioquímicos y moleculares que subyacen a la LTP se ha descrito la participación del neurotransmisor excitatorio glutamato. El glutamato activa a los receptores a glutamato AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico), dando lugar a la entrada de sodio al interior de la célula, contribuyendo de esta forma a la despolarización de la neurona postsináptica. Por su parte, los receptores ionotrópicos glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) presentan un bloqueo de magnesio en el poro del canal, que es liberado cuando la membrana es despolarizada. Esta característica produce que los receptores NMDA solo puedan ser activados después de que se ha liberado el bloqueo de magnesio, por ejemplo, cuando se presenta estimulación repetitiva. Dicha propiedad hace del receptor NMDA un detector de coincidencia entre la actividad de la pre y la postsinapsis, lo cual subraya su importancia en los fenómenos plásticos de tipo asociativo (Bear et al., 2001). Los receptores NMDA tienen la característica de que al ser activados permiten la entrada de calcio al interior

de la célula (Jahr y Stevens, 1987; Ascher y Nowak, 1988). La entrada de calcio utilizando estos receptores acoplados a un canal y a través de canales de calcio dependientes de voltaje, hace posible la presencia de la LTP, al provocar cambios en las concentraciones de calcio intracelular. El calcio activa a la proteína llamada calmodulina, que funciona como una señal para activar distintas vías de transducción al interior de la célula, haciendo posible el mantenimiento del incremento en la eficacia sináptica por periodos prolongados (Kennedy y Marder, 1992). La entrada de calcio, por intermediación de la proteína calmodulina, causa entre otras cosas, la activación de dos cinasas (enzimas que tienen la capacidad de fosforilar diferentes moléculas), la calcio calmodulina cinasa II (CaMK II) y la proteína cinasa C (PKC), además, la calmodulina activa a la proteína adenil ciclasa; la cual produce adenosin monofosfato cíclico (AMPc) a partir de moléculas de adenosin trifosfato (ATP), que a su vez activa a la proteína cinasa A (PKA) (Kennedy y Marder, 1992). PKA tiene la función de translocar al núcleo, fosforilando al factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento responsivo al AMPc) (Hagiwara et al., 1993) (Figura 3).

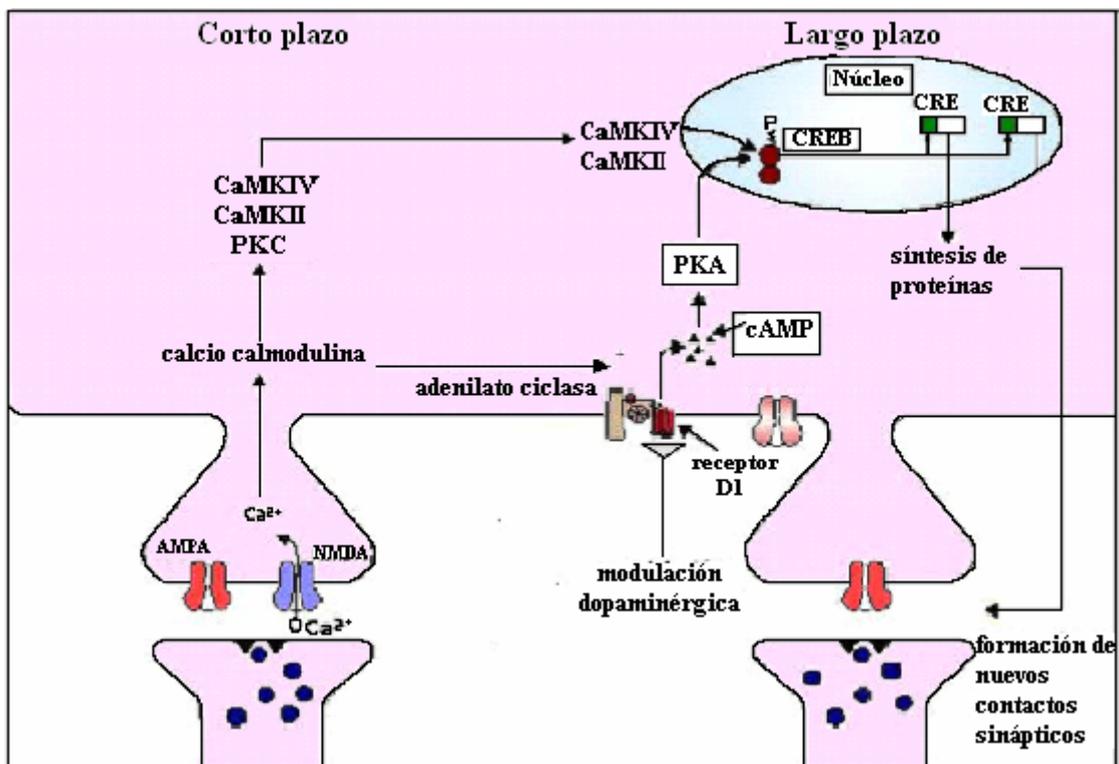


Figura 3. Mecanismos moleculares de la potenciación de largo plazo. Esquema representativo de las principales vías de señalización involucradas con la LTP (Modificado de Milner et al., 1998)

Los datos anteriores indican que los cambios en la eficiencia sináptica por breves periodos de tiempo recaen básicamente sobre la modificación enzimática de proteínas preexistentes, sin embargo, para el mantenimiento de la LTP por periodos prolongados de tiempo, son necesarios tanto la expresión de genes, como la síntesis de proteínas de novo (Lynch, 2004; Abraham y Williams, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la memoria a corto plazo tiene una duración de pocas horas, y la memoria a largo plazo persiste por varios días o años. A nivel celular, la memoria a largo plazo es asociada con la expresión de genes, síntesis de proteínas de novo y la formación de nuevos contactos sinápticos. Existe una interesante relación entre la memoria y la LTP, debido a que dicho fenómeno consiste en distintas fases que involucran diferentes mecanismos moleculares. La inducción (fase temprana), es el desencadenamiento de la LTP, cuyo mecanismo es independiente de la síntesis proteica, y la etapa de mantenimiento (fase tardía), es el sostenimiento de la potenciación, cuya duración va de horas in vitro hasta meses in vivo, y su mecanismo es dependiente de la síntesis de proteínas (Pang et al., 2004).

2.1.3 LTP en la neocorteza

La LTP fue inicialmente descrita en el hipocampo, una estructura implicada en diversas formas de aprendizaje y memoria. En la actualidad, existen claras evidencias de que la LTP puede ser inducida en la neocorteza, considerada como el almacén de las memorias de largo plazo. Los trabajos realizados en dicha área han usado una extensa variedad de protocolos de estimulación, algunas ocasiones incluyendo una reducción de la inhibición modulada por el receptor GABA (Kanter y Haberly; 1993), demostrando la gran complejidad que se ha debido enfrentar para la inducción de la LTP en la neocorteza. En el caso de la corteza visual del gato parece existir una correlación entre la edad y la capacidad de inducir LTP (Bear y Kirkwood, 1993; Kirkwood et al., 1995), también es necesario ampliar el rango de frecuencia y el número de estimulaciones tetánicas. Entre las áreas neocorticales que se han reportado

presentan el fenómeno de LTP se encuentran la corteza primaria visual del gato (Komatsu et al;1988) y rata (Artola y Singer;1990), la corteza somatosensorial del gato (Lee et al;1991) la corteza prefrontal de la rata (Hirsch y Krepel,1990), la corteza somatosensorial y motora de rata (Rioul-Pedotti et al;2000), la corteza entorrinal de ratas (Quinlan et al.,2004) y en la corteza insular de ratas, específicamente en la vía que va del núcleo basolateral amigdalino a la zona agranular de la corteza insular (Escobar et al.,1998a; Jones et al.,1999).

2.1.4 LTP y conducta

La principal evidencia a favor de una relación entre el aprendizaje y la LTP, proviene de estudios realizados en la amígdala, por dos grupos independientes. Rogan y su grupo en 1997 observaron que el condicionamiento al miedo produce incrementos en la pendiente y la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) en la amígdala lateral de ratas adultas *in vivo* (Rogan et al; 1997). Por otra parte McKernan y Shinnick-Gallagher describieron que el entrenamiento en el condicionamiento al miedo produce una facilitación presináptica de la amígdala lateral en preparaciones *in vitro*, 24 hr después del entrenamiento de dicha tarea en ratas adultas (McKernan y Shinnick-Gallagher; 1997). En relación con lo anterior, pero en el hipocampo, un estudio reciente demostró un incremento de la eficacia sináptica en CA1 en ratas adultas *in vivo* después del entrenamiento en el paradigma de evitación inhibitoria (Whitlock et al., 2006). También se ha observado que la corteza motora primaria de ratas adultas presenta cambios en la eficacia sináptica después de haber realizado una tarea de aprendizaje de habilidad motora, la amplitud de los EPSPs en la corteza motora primaria del hemisferio entrenado aumentó significativamente con respecto a la corteza motora primaria del hemisferio contralateral usada como control (Rioul-Pedotti et al., 1998). Se ha observado que cambios en la eficiencia de la transmisión sináptica semejantes a los que ocurren durante la LTP, también pueden ser inducidos en humanos durante el aprendizaje de una habilidad conductual. Un claro ejemplo es el reportado por Muellbacher en el 2001, en este estudio se entrenó a un grupo de individuos a incrementar la velocidad

en el movimiento de su dedo pulgar, este aprendizaje está asociado con un cambio rápido en la excitabilidad de la corteza motora primaria, análogo a lo encontrado por Rioult-Pedotti et al. en 1998 (Muellbacher et al., 2001). No solo tareas motoras modifican plásticamente el sistema nervioso humano, también se ha observado que la estimulación auditiva de alta frecuencia provoca incrementos en los potenciales evocados medidos con métodos encefalográficos, lo cual muestra que la estimulación de diferentes modalidades sensoriales produce cambios en la excitabilidad de el área que se encuentra involucrada con dicha estimulación (Clapp et al., 2005). También se ha observado que es posible inducir fenómenos plásticos a través de la estimulación magnética transcraneal en humanos; con la ayuda de dicha técnica se pueden inducir incrementos o decrementos en la excitabilidad en la corteza motora primaria debido a la inducción de determinado protocolo de estimulación, de manera análoga a lo que sucede en la inducción de LTP y LTD (Muellbacher et al., 2001; Stefan et al., 2000; Wolters et al., 2003). Estas evidencias sostienen la hipótesis de que durante el aprendizaje existen incrementos de la eficiencia sináptica similares a los que ocurren en la LTP.

2.2 Plasticidad homeostática

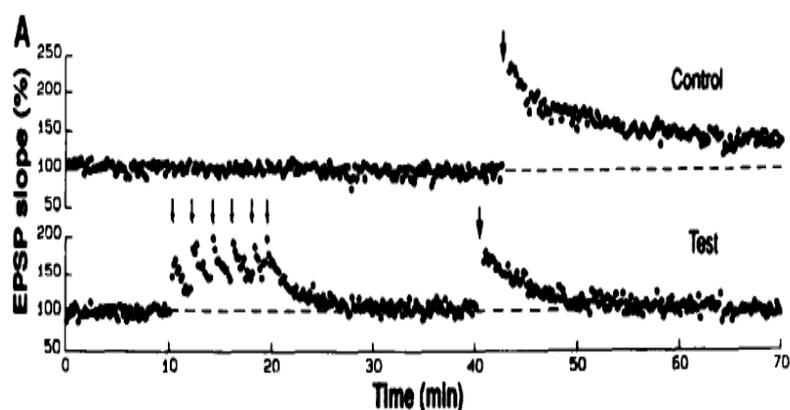
Experiencias, tales como el aprendizaje, eventos estresantes o la ingesta de sustancias psicoactivas, impactan el cerebro modificando la actividad y organización de circuitos neuronales específicos. La plasticidad sináptica se refiere a las modificaciones en la comunicación neuronal dependientes de la actividad, teniendo un papel central en la capacidad del cerebro para incorporar experiencias transitorias dentro de persistentes trazos de memoria.

El sistema nervioso esta sujeto a dos requerimientos opuestos: la necesidad de cambio y la necesidad de estabilidad. Los procesos que permiten un cambio en las redes neuronales son conocidos como modificaciones de tipo “hebbiano”, éste tipo de plasticidad se basa en la correlación de la actividad pre y postsináptica. Fenómenos como la LTP y la LTD son un claro ejemplo de plasticidad hebbiana, siendo críticos para el almacenamiento de la información debido a que producen cambios asociativos en el fortalecimiento

de las conexiones sinápticas, promoviendo inestabilidad en las redes neuronales debido a que la eficiencia de una vía es cambiada drásticamente (Turrigiano y Nelson, 2000). En contraste, un segundo tipo de plasticidad sináptica descrita, es la llamada “plasticidad homeostática”, la cual mantiene estados estables de actividad, dichos mecanismos dinámicamente ajustan la fortaleza sináptica para promover la estabilidad de los circuitos neuronales. Sin plasticidad homeostática, fenómenos como la LTP o la LTD provocarían niveles de actividad extremos que pueden producir muerte neuronal (ya sea por exceso o por falta de actividad). Se han distinguido dos mecanismos principales de regulación homeostática: la metaplasticidad y el escalamiento sináptico.

2.2.1 Metaplasticidad y escalamiento sináptico

Actualmente se sabe que la historia de actividad de las neuronas modula las futuras respuestas a determinados estímulos, para adaptarse a los requerimientos del sistema. Se han observado cambios subsecuentes al inducir LTP en una misma vía, estos cambios incluyen la inhibición de la LTP y la facilitación de la LTD (Malenka, 1991; Huang et al., 1992) a este fenómeno se le conoce como metaplasticidad, la cual se define como el cambio en la habilidad para inducir subsecuentes cambios en la plasticidad sináptica (Abraham y Bear, 1996) (Figura 4).



En 1982 Bienestock et al., propusieron la existencia de un umbral de activación postsináptica, es decir, una vía es potenciada cuando la activación postsináptica excede un valor crítico llamado umbral de modificación ó θ_m , mientras que una vía es depotenciada cuando la activación postsináptica es mayor que cero pero menor que el valor θ_m (Figura 5). Es importante recalcar que este umbral no es fijo (Bienestock et al., 1982; Cooper et al., 1979), y su modificación es temporal, por lo tanto, es considerado como un mecanismo homeostático que protege a las neuronas, por ejemplo, de estímulos de muy alta intensidad o frecuencias que pudieran provocar excitotoxicidad (Bear, 2003). Sin embargo la relevancia de dicho fenómeno parece ser mayor. El hecho que se presenten cambios metaplásticos durante tareas de aprendizaje o debido a la estimulación nos hace pensar que su papel no es solo protector, sino modulador de la información.

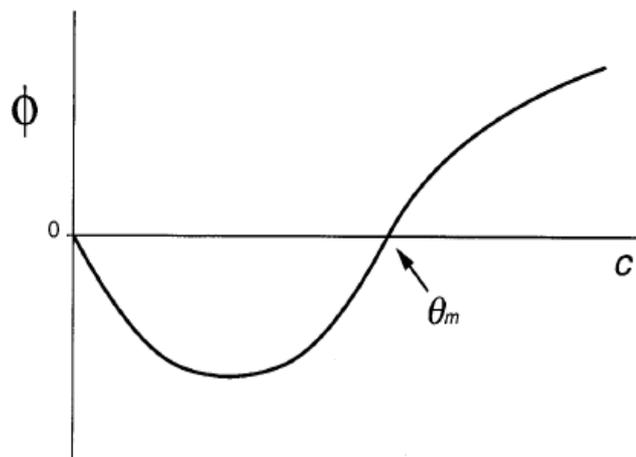


Figura 5. Modelo BCM. Función que explica la relación entre el nivel de potenciación (Φ) y el nivel de excitación postsináptica (c). La grafica muestra como al ir aumentando, a partir de cero, el nivel de activación de la postsinapsis o la frecuencia de estimulación (eje de las abscisas) se observa primero un decremento en el nivel de potenciación (LTD) (eje de las ordenadas) y a medida que incrementa el nivel de activación nos encontramos con el umbral θ_m , tras cruzar dicho umbral se observa un incremento en la eficiencia sináptica (LTP) (tomado de Bear, 1996)

Se han reportado investigaciones en donde la privación de estímulos visuales incrementa la posibilidad de inducir LTP en la corteza visual primaria la cual está acompañada de un aumento en la expresión de las subunidades NR2B de los receptores NMDA, mientras que la estimulación visual aumenta la capacidad de inducir LTD por medio de la expresión de las subunidades NR2A

en esta vía (Yashiro y Philpot, 2008). Por lo tanto, se ha propuesto un mecanismo mediante el cual los cambios en el umbral θ_m son dependientes de la proporción de las subunidades del receptor NMDA (Figura 6A) (Quinlan et al., 2004). La subunidad NR2A tiene una cinética más rápida, es decir, en el mismo tiempo, los canales NMDA que contienen la subunidad NR2A se abren y se cierran un mayor número de veces que cuando estos canales contienen la subunidad NR2B (Erreger et al., 2005). Este efecto produce que los receptores NMDA que contengan subunidades NR2A, presenten una mayor resolución (es decir, responden más efectivamente) ante los estímulos de alta frecuencia, como los que inducen LTP, mientras que los que contengan la subunidad NR2B tendrán una mayor resolución ante estímulos de baja frecuencia, como los que inducen LTD (Pérez-Otaño y Ehlers, 2005; Quinlan et al., 2004).

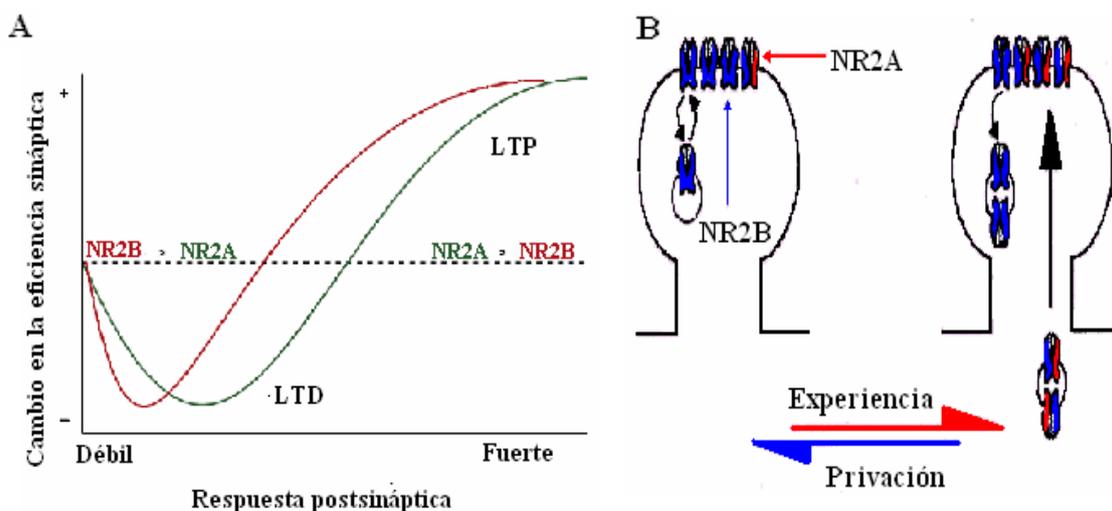


Figura 6. Metaplasticidad. A) mecanismo a través del cual es modificado el umbral θ_m en respuesta a la actividad. B) mecanismos de la metaplasticidad en la corteza visual primaria, en donde la privación de estímulos visuales incrementa la posibilidad de inducir LTP por medio de un aumento en la expresión de las subunidades NR2B de los receptores NMDA, mientras que la estimulación visual (experiencia) aumenta la capacidad de inducir LTD por medio de la expresión de las subunidades NR2A en esta vía (Modificado de Philpot et al., 2008).

La actividad produce un aumento en la cantidad de subunidad NR2A en el espacio sináptico, haciendo que se requieran frecuencia más altas para introducir la misma cantidad de calcio, modificando el umbral θ_m (figura 6B)

(Pérez-Otaño y Ehlers, 2005). Esto provoca que con la misma frecuencia de estimulación se induzca una LTP de menor magnitud. De la misma forma, la LTD es más fácil de inducir, ya que con frecuencias con las que normalmente se induce LTP, se induce LTD o no se presenta ningún cambio en la eficiencia sináptica (Pérez-Otaño y Ehlers, 2005; Philpot et al., 2001)

El exceso de actividad en una neurona puede ocasionar que la célula presente actividad epiléptica o incluso muerte celular por excitotoxicidad, mientras que la falta de actividad promueve la muerte neuronal por medio de procesos de degradación (Hardingham y Bading, 2003). Las células neuronales requieren de un equilibrio en su nivel de activación y existe una serie de mecanismos homeostáticos que ayudan a mantenerlo. Dichos mecanismos son englobados en un fenómeno que es conocido como escalamiento sináptico (Turrigiano y Nelson, 2004), el cual mantiene en un nivel relativamente estable la excitabilidad neuronal mediante un incremento progresivo de la eficiencia sináptica en respuesta a la inhibición prolongada de la actividad, y un decremento progresivo de la eficiencia sináptica en respuesta a la actividad crónica. En 1998, Turrigiano y su grupo reportaron que el bloqueo crónico de receptores al GABA (ácido γ -aminobutírico) durante 48 horas, produce un decremento progresivo de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (CPSEm), compensando el aumento en la actividad en ausencia de dichos receptores. Cuando se presenta inhibición crónica de los canales de sodio se produce un incremento en las CPSEm, compensando la disminución en la actividad (Turrigiano et al., 1998; Turrigiano y Nelson, 2004) (Figura 7).

Este fenómeno se ha observado en cultivos de células neocorticales, hipocampales, de la médula espinal, en el núcleo accumbens e incluso en animales in vivo (Abbott y Nelson, 2000) y muestra que las células del sistema nervioso tienen la capacidad de integrar los estímulos recibidos para ajustar la eficiencia sináptica a través de la modulación de la conductancia de sus canales (Turrigiano y Nelson, 2000).

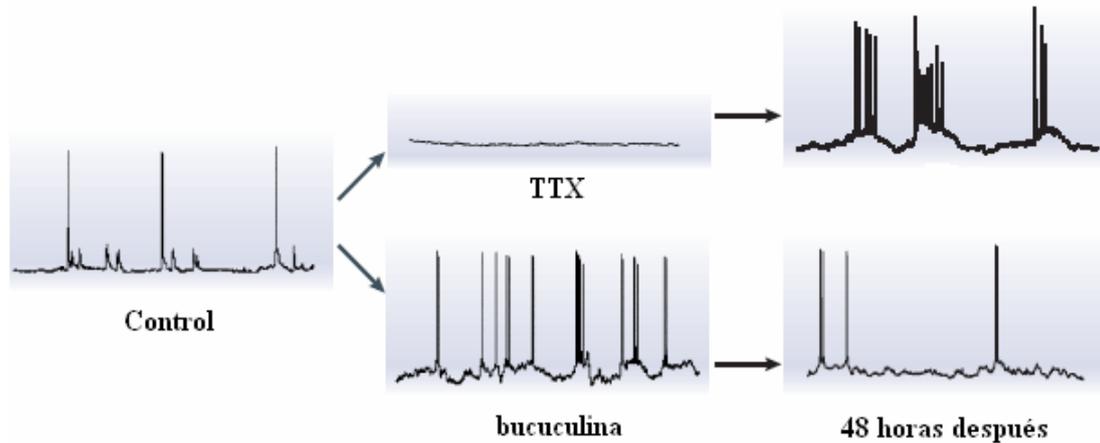


Figura 7. Escalamiento sináptico. El bloqueo crónico de la actividad producido por la aplicación de TTX incrementa progresivamente las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (CPSEm), y el incremento prolongado de la actividad producido por la aplicación de bicuculina decreta progresivamente las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (CPSEm) (Modificado de Turrigiano & Nelson; 2004)

2.2.2 Metaplasticidad y conducta en la neocorteza

Los cambios metaplásticos se encuentran representados en diversas áreas del sistema nervioso central como la neocorteza o el hipocampo, consideradas como el almacén de diversos tipos de memoria (Bear, 1996). El entrenamiento en determinadas tareas conductuales produce cambios en la posibilidad de inducir subsecuente plasticidad. Rioult-Pedotti y colaboradores en el 2000, entrenaron a un grupo de ratas en el aprendizaje de una tarea motora, posterior al entrenamiento (ver figura 8), se indujo potenciación de largo plazo en el hemisferio entrenado y se observó que dicha tarea reduce la magnitud de la LTP y aumenta la magnitud de la LTD, comparada con el hemisferio contralateral el cual se utilizó como control, mostrando que la conducta produce cambios en las propiedades neuronales que van a modificar el umbral para la inducción de subsecuente plasticidad sináptica (Rioult-Pedotti et al., 2000).

Los cambios metaplásticos inducidos por la conducta también se han encontrado en la corteza piriforme debido a tareas de discriminación olfativa (Quinlan et al., 2004) en la corteza visual en respuesta a la estimulación visual (Philpot et al., 2007), en la amígdala lateral debido al condicionamiento al miedo (Schroeder y Shinnick-Gallagher, 2005), en la

corteza somatosensorial debido a la estimulación de las vibrisas (Clem et al., 2008).

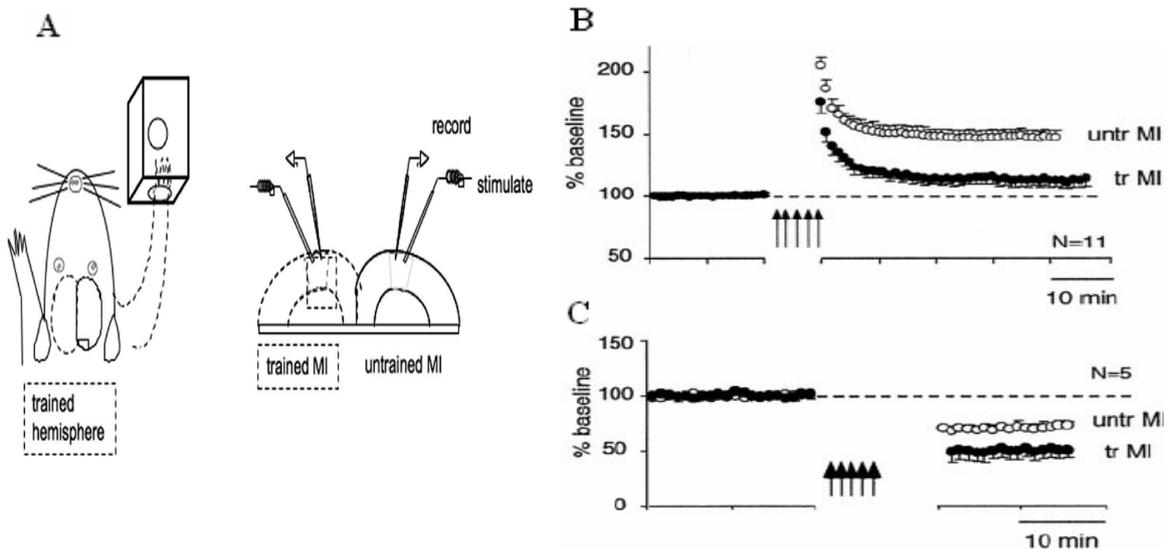


Figura 8. El entrenamiento en habilidades motoras modifica la subsecuente inducción de plasticidad en la corteza motora. A) aprendizaje de una tarea motora que consiste en sacar comida de un pequeño agujero con una pata. **B)** el entrenamiento en tareas motoras decrementa la magnitud de la LTP. **C)** el entrenamiento en tareas motoras incrementa la LTD. El eje de las ordenadas representa el porcentaje con respecto a la línea base tomada antes de la inducción de los trenes. Círculos negros: hemisferio entrenado. Círculos blancos: hemisferio no entrenado (Rioult-Pedotti., 2000).

También se ha observado que la inducción de LTP en la corteza insular antes del condicionamiento aversivo a los sabores (CAS), provoca una disminución en el consumo de sacarina durante las pruebas de extinción, es decir, aumenta la retención del condicionamiento aversivo a los sabores (Escobar et al; 2000). Datos de nuestro laboratorio indican que el entrenamiento en el CAS modifica la posibilidad de inducir subsecuente LTP en corteza insular en ratas adultas *in vivo*. Esto nos muestra que los mecanismos mediante los cuales actúa la LTP tienen coincidencias con los mecanismos de los cuales dependen dichas tareas conductuales. El efecto metaplástico que produce la conducta sobre la LTP y la LTD ha llevado a la comunidad neurocientífica a considerar los fenómenos de plasticidad homeostática como mecanismos reguladores de las funciones neuronales, que subyacen al almacenamiento de la información.

2.3 Condicionamiento aversivo a los sabores

El condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) es un paradigma de aprendizaje ampliamente utilizado para el estudio de los procesos de aprendizaje y memoria. En este modelo conductual un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo novedoso cuando éste se asocia con una irritación gástrica (Figura 9). El condicionamiento aversivo a los sabores fue originalmente descrito por García en 1955, quien observó que las ratas desarrollan aversión a soluciones con sabor dulce cuando éstas son seguidas por la aplicación de rayos gamma. Para García este era un claro ejemplo de aprendizaje, en el que el animal relacionaba el sabor con algún efecto de malestar. Más tarde surgió un paradigma que se obtuvo de la asociación del sabor con un estímulo que produjera irritación gástrica como el cloruro de litio (LiCl) (García y Koellin, 1967), fue entonces cuando a este paradigma se le llamó condicionamiento aversivo a los sabores. El CAS es un tipo de condicionamiento donde el sabor novedoso sirve como estímulo condicionado y el malestar gástrico como estímulo incondicionado, de modo que el estímulo gustativo adquiere la capacidad de inducir una respuesta condicionada.

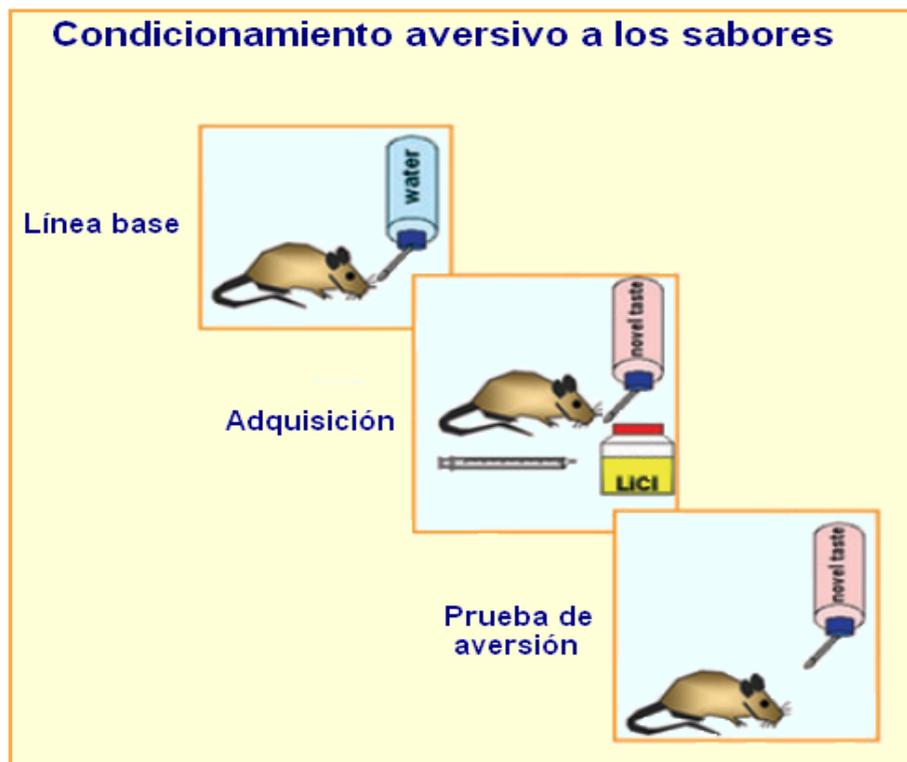


Figura 9. Condicionamiento aversivo a los sabores. Cuando un sabor novedoso es asociado con un malestar gástrico da como resultado que en las siguientes presentaciones del sabor, éste evoque un malestar gástrico, provocando que el animal muestre aversión a dicho sabor, evitando su consumo.

A continuación se presentan los principios generales del CAS:

- Si el animal consume un alimento con sabor y subsecuentemente sufre malestar gástrico, en los siguientes encuentros con ése sabor el animal evitará o disminuirá drásticamente su consumo (García et al; 1985).
- La fuerza de la aversión aprendida está directamente relacionada con la intensidad del sabor y del malestar, y está inversamente relacionada con el intervalo entre la presentación del sabor y la inducción del malestar. Éste intervalo puede durar horas, a diferencia de otros condicionamientos, en los cuales es necesario que el intervalo entre el estímulo condicionado y la respuesta incondicionada sea de segundos (Domjan, 1985).
- Los estímulos gustativos se asocian más fácilmente a estímulos gástricos (García y Koellin, 1966).

Las evidencias anteriores indican que para sobrevivir, los animales deben seleccionar los nutrientes y evitar alimentos tóxicos. Los animales pueden asociar sabores con los efectos gástricos, aparentemente como resultado de la coevolución entre los mecanismos protectores y la información visceral que sigue a la ingestión, determinando en gran parte la futura conducta de ingestión de los animales.

Tras el descubrimiento del CAS se comenzaron a estudiar los mecanismos cerebrales de los procesos de aprendizaje gustativo. Los resultados fueron múltiples, sin embargo, el más sobresaliente fue en 1972 cuando se reportó que la región cortical conocida en ese entonces como corteza gustativa estaba involucrada en el CAS, en vista de que las lesiones en esta región producían considerables deficiencias en el aprendizaje de la evitación al sabor (Bermúdez-Rattoni, 2004). También se ha demostrado que lesiones bilaterales en la corteza insular antes o después de la adquisición del CAS deteriora el aprendizaje o la evocación (McGowan et al., 1972; Bermúdez-Rattoni y Yamamoto, 1998).

2.3.1 Corteza insular, la vía gustativa y el CAS

La corteza insular (CI), es un área neocortical ubicada en las regiones 13 y 14 de Krieg en el lóbulo temporal del cerebro de la rata. A partir de sus características citoarquitectónicas se pueden distinguir tres zonas en su estructura: agranular, disgranular y granular, dependiendo de la menor o mayor presencia de neuronas granulares (capa cortical IV). La corteza insular en ratas comprende un área de aproximadamente 3 mm x 1 mm que corre por encima y a lo largo del surco rhinal, alrededor de la arteria cerebral media (Braun et al; 1982), se extiende dorsalmente hacia los bordes de las áreas somatosensoriales primaria y secundaria; posee un región anterior que es principalmente agranular y una región posterior con dos subregiones denominadas disgranular y granular. La corteza insular agranular se fusiona imperceptiblemente con la corteza perirhinal (Paxinos y Watson, 1995).

En la actualidad se cuenta con información precisa que describe cual es el recorrido anatómico que siguen los estímulos gustativos de la periferia hacia la neocorteza, basándose en estudios anatómicos, electrofisiológicos y conductuales. Todo comienza cuando un sabor es detectado por los receptores gustativos de la boca y transmitido hacia la porción anterior del núcleo del tracto solitario (NTS) en el tallo cerebral, vía los nervios craneales facial (VII) y glossofaríngeo (IX) principalmente y de manera secundaria por el vago (X). El segundo relevo del estímulo gustativo se ubica en el núcleo parabraqueal del puente, en lo que se ha denominado área gustativa del puente (Pontine Taste Area, en inglés PTA). Una vez aquí se reconocen dos rutas a seguir: en su mayoría las aferencias del PTA se dirigen a estructuras ventrales del cerebro basal, como son la amígdala, la zona lateral del hipotálamo y la sustancia innominata. La segunda ruta se dirige al complejo ventrobasal del tálamo, el cual se comunica con la corteza insular (Travers, 1993) (Figura 10).

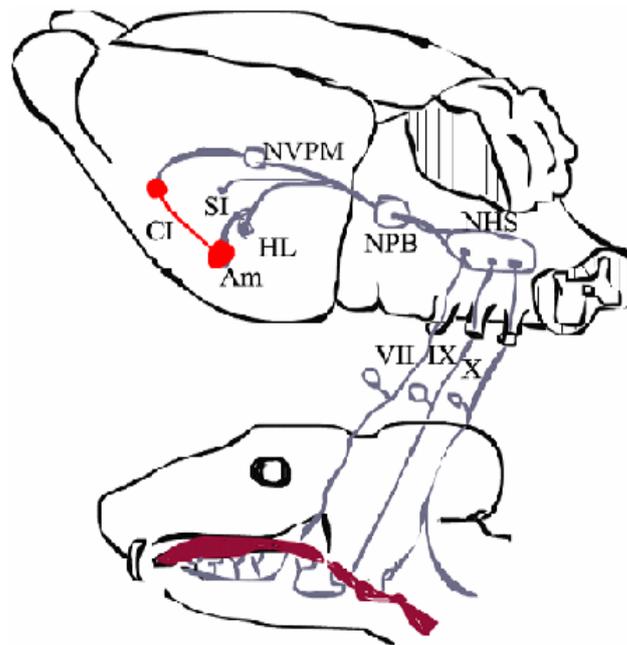


Figura 10. Vía gustativa. Esquema donde se muestra la vía gustativa. (Abreviaturas: VII nervio facial; IX, nervio glossofaríngeo; X, nervio vago; NHS, núcleo del haz solitario; NPB, núcleo parabraquial del puente; NPVM, núcleo ventroposteromedial del tálamo; CI, corteza insular; SI, sustancia innominada; HL, hipotálamo lateral; Am, amígdala) (Modificado de Bear et al., 2001)

Se ha observado que durante el aprendizaje del CAS, el consumo del sabor novedoso incrementa la fosforilación de la tirosina de la subunidad NR2B del receptor NMDA en la corteza insular (Rosenblum et al., 1997), y su inhibición bloquea las memorias aversivas, incluyendo la aversión al sabor (Yashosima y Yamamoto, 1997). Dicho proceso de fosforilación podría facilitar la formación de la versión inducida por el malestar, debido a que potencia la actividad del receptor NMDA, relacionándose con la activación de la señalización intracelular (Mizuno et al., 2003). Investigaciones previas han reportado que la síntesis de proteínas en la corteza insular es requerida la formación de la memoria gustativa, pues su inhibición bloquea la consolidación del CAS (Rosenblum et al, 1993), mientras que tal deficiencia de la memoria al CAS puede ser revertida por la administración de BDNF en la corteza insular (Moguel-González et al., 2008). Entre otros mecanismos que se han observado, destaca la participación del sistema colinérgico. Miranda et al. (2000) observaron un incremento en la liberación de acetilcolina (ACh) en la corteza insular inducida por la presentación de un sabor novedoso, comparada

con la liberación ocasionada por la presentación de un sabor familiar, esto es altamente significativo porque la novedad del sabor es un factor determinante en el establecimiento del trazo de memoria gustativa. Por otra parte, se ha demostrado que la inyección de LiCl provoca un marcado incremento en la liberación de glutamato tanto en la amígdala como en la CI, además, mientras la inyección de una baja concentración de LiCl después de la presentación de la sacarina induce un CAS débil, se puede producir un CAS intenso con una baja concentración de LiCl cuando es acompañada por microinfusiones de glutamato en la amígdala (Miranda et al., 2000), por lo tanto, es de particular interés la conectividad recíproca y funcional de la CI con la amígdala, estructura cerebral vinculada estrechamente con la memoria aversiva (LeDoux, 1993; McGaugh et al., 1990), específicamente las proyecciones que recibe directamente del núcleo basolateral amigdalino (Krettek y Price, 1974; Escobar et al., 1989; Bermúdez-Rattoni y McGaugh., 1991). A partir de esto ha sido posible considerar a la CI como una estructura fundamental en los procesamientos de integración y almacenamiento de información gustativo-visceral, capaz de dirigir conductas motivadas por este tipo de información, como la evitación o aceptación de un alimento dependiente de una experiencia gustativa previa (Bermúdez-Rattoni, 2004; Simon et al., 2006).

2.3.2 Corteza insular, LTP y CAS

La CI y la amígdala contribuyen a la formación y retención de la memoria asociada al malestar gástrico (Bermúdez-Rattoni y MaGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni et al., 2004). En 1998, Escobar y colaboradores reportaron que mediante la estimulación de alta frecuencia a las aferencias provenientes del núcleo basolateral amigdalino, se podía inducir LTP en la corteza insular de ratas adultas in vivo, y que la administración intracortical de antagonistas del receptor glutamatérgico NMDA (CPP y MK801) bloquean la adquisición del CAS, así como la inducción de la LTP en ésta vía (Escobar et al., 1998a; Escobar et al., 1998b), indicando una facilitación cortical inducida por la estimulación de la amígdala, que parece estar regulada por el glutamato a través del receptor NMDA en la corteza insular. Recientes investigaciones demuestran que la inducción de LTP en la proyección (Bla-CI) previa al entrenamiento del CAS,

aumenta la retención de esta tarea (Escobar et al., 2000). La microinfusión de BDNF en ausencia de estimulación tetánica, es capaz de inducir por si solo LTP en la corteza insular (Escobar et al., 2003), y la administración de ésta neurotrofina previa al entrenamiento en el CAS incrementa la retención de dicha tarea (Castillo et al; 2006).

Un estudio realizado en nuestro laboratorio reveló que el entrenamiento en el CAS previene la subsecuente inducción de LTP en la vía Bla-CI; en esta investigación se le entrenó a un grupo de ratas en el CAS, 48, 72, 96 y 120 horas después de concluida la fase conductual, los animales fueron sometidos a una fase electrofisiológica para inducir LTP en la CI; los datos obtenidos mostraron que en todos los grupos hubo una imposibilidad de inducir LTP en la CI con estimulación de alta frecuencia y que el efecto producido por el CAS sobre la LTP en la CI era persistente, ya que se mantenía hasta 5 días después de la adquisición. Estos resultados apoyan la noción actual de que los mecanismos responsables de los cambios plásticos ocurridos durante el aprendizaje son similares a los encargados de inducir LTP.

Los datos anteriores sugieren que la potenciación de la proyección amigdalocortical es un posible mecanismo de las funciones mnémicas ejecutadas por la corteza insular.

2.4 Proteína cinasa M zeta (PKM ζ)

La actividad enzimática se encuentra estrechamente relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria. Numerosos estudios han enfocado su atención sobre la participación de las proteínas cinasas, entre las cuales han destacado la Calcio-calmodulina cinasa tipo II (CaMKII), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y proteína cinasa C (PKC) (Sweatt, 1999); cada una de esas cinasas se activa a través de segundos mensajeros como el calcio. Aunque algunas de éstas modificaciones, tales como la autofosforilación de CaMKII (Lisman, 1994) pueden ser persistentes, eventualmente, dichas cinasas regresan a su estado inactivo o son remplazadas por sus precursores (Schwartz and Greenberg, 1987; Schwartz 1993). La mayoría de las funciones de las proteínas cinasas antes mencionadas, intervienen en la fase de inducción de la LTP y durante la

etapa inicial del aprendizaje y la consolidación de la memoria. En contraste, sólo la actividad de una proteína cinasa, una atípica proteína cinasa C isoforma (aPKC), es esencial durante el mantenimiento de la LTP y para la persistencia del almacenamiento de la información (Sacktor et al., 1993; Ling et al., 2002; Pastalkova et al., 2006).

La familia de PKC está formada por 15 isoformas derivadas de 9 genes diferentes, cada una con funciones celulares individuales (Newton, 2001). Basado en los mecanismos de activación y en la secuencia de aminoácidos, Nishizuka dividió a las PKC en tres grupos: las convencionales, las novedosas y las atípicas (Nishizuka, 1988; Nishizuka, 1995) (Figura 11).

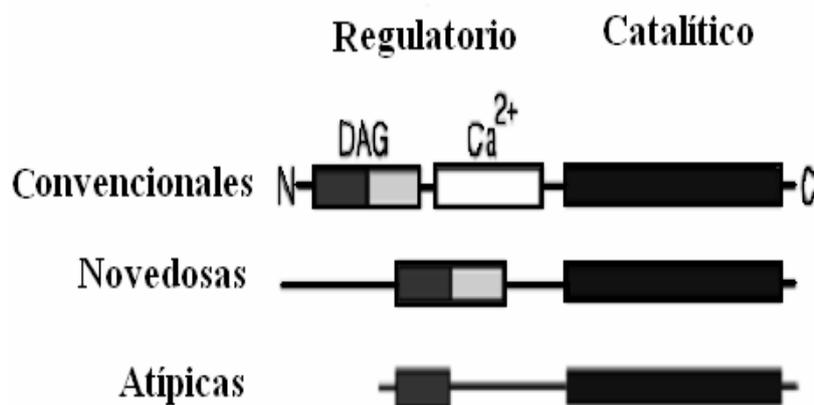


Figura 11. Clasificación de las PKCs. En función a sus mecanismos de activación, las PKCs han sido clasificadas en convencionales, novedosas y atípicas (Naik et al., 2000)

Las PKCs convencionales (α , βI , βII y γ) son activadas por segundos mensajeros como diacilglicerol (DAG) y calcio. Las PKCs novedosas (δ , ϵ , η y θ) son activadas por DAG, pero no por calcio. Las PKCs atípicas (ζ , y ι/λ) no son activadas por DAG o calcio, sin embargo contiene un sitio de unión para segundos mensajeros, tales como ácido araquidónico y fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato.

Una típica PKC isoforma contiene un dominio regulatorio en su terminal-amino y un dominio catalítico en su terminal-carboxilo (Newton, 2001). El dominio regulatorio contiene sitios de unión para segundos mensajeros (como calcio y diacilglicerol), y una secuencia pseudosustrato que inhibe al dominio

catalítico. Al activarse PKC, se produce un cambio conformacional que libera la autoinhibición del pseudosustrato; esta activación es usualmente transitoria porque los segundos mensajeros son metabolizados rápidamente y la enzima regresa al estado inactivo, esperando hasta su siguiente activación. Una de las isoformas de PKC, llamada PKM zeta (PKM ζ), en contraste, es generada por la síntesis de un ARNm que codifica un dominio catalítico ζ sin un dominio regulatorio (Hernández et al., 2003). Así, los segundos mensajeros que activan a PKC, no son requeridos para estimular a PKM ζ (Figura 12).

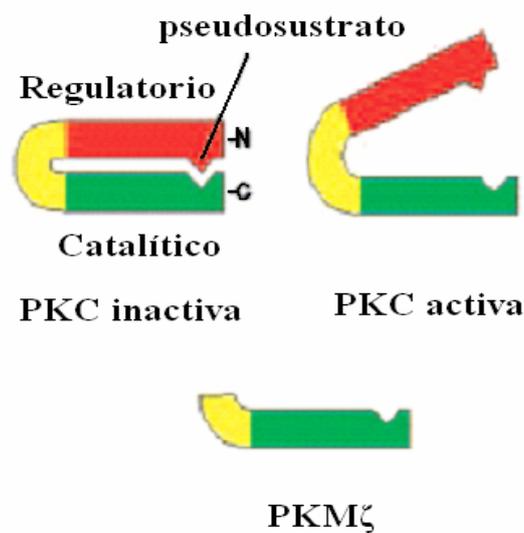


Figura 12. Estructura de PKC y PKM ζ . Modelo de la conformación activa e inactiva de PKC. PKC es mantenida en un estado inactivo por la interacción del pseudosustrato y el dominio catalítico (arriba). PKM ζ se caracteriza por un dominio catalítico independiente, el cual carece de un dominio regulatorio (abajo) (modificado de Hernández et al., 2003)

PKM ζ es el producto de un ARNm generado de un promotor interno del gen de PKC ζ ; el gen ζ produce dos tipos de ARN de dos promotores distintos: un ARNm para PKC ζ (Ono et al., 1989) y un ARNm para PKM ζ (Ono et al., 1988). Tanto el ARN de PKM ζ como la proteína codificada son expresados únicamente en el cerebro. El promotor del gen de PKC ζ que genera al ARNm de PKM ζ en el ratón, la rata y el humano contiene un elemento responsivo al AMPc (CRE), también como sitios para el factor de transcripción nuclear (NF κ B), cada uno de esos factores de transcripción han sido implicados en la formación de la memoria (Hernández et al., 2003)

PKM ζ es una proteína cuyo peso molecular oscila alrededor de los 51 kDa, se encuentra distribuida en todo el cerebro, presentando altos niveles de expresión en la corteza, la región CA1 del hipocampo, el estriado y el hipotálamo (Naik et al., 2000) .

En los últimos años, ha destacado de manera significativa la participación de PKM ζ en el mantenimiento de los procesos plásticos durante periodos prolongados.

2.4.1 Proteína cinasa M zeta y la LTP

Durante la fase de inducción de la LTP, múltiples isoformas de PKC (α , β I, β II, δ , y η) son activadas transitoriamente, pasando de su estado inactivo en el citoplasma, a su conformación activa sobre la membrana celular. En contraste, durante la fase de mantenimiento de la LTP, únicamente PKM ζ se encuentra activada persistentemente (Sacktor et al., 1993).

Se ha observado que los niveles de PKM ζ se incrementan significativamente durante la LTP, y que este incremento se restringe únicamente a la fase tardía del fenómeno (Sacktor et al., 1993); por otro lado, se ha descrito que los niveles de PKM ζ pueden disminuir en respuesta a la estimulación de baja frecuencia capaz de inducir depresión de largo plazo (LTD) (Hrabetova y Sacktor, 1996); este decremento requiere de la actividad proteolítica y persiste por varias horas en preparaciones *in vitro* (Hrabetova y Sacktor, 2001)

Trabajos realizados en rebanadas de hipocampo han mostrado que la infusión intracelular de PKM ζ , incrementa la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (CPSEm) moduladas por el receptor AMPA en cuestión de minutos, además, la aplicación de queleritrina, un inhibidor del dominio catalítico de PKC, revierte la potenciación hasta llegar nuevamente a la línea base, indicando que la actividad de PKM ζ es continuamente requerida para la potenciación sináptica. Asimismo, la aplicación del péptido inhibidor del pseudosustrato zeta (ZIP por sus siglas en inglés), específico para PKM ζ , también bloquea la potenciación (Serrano et al; 2005). Se ha observado que el incremento en las CPSEm impide la subsecuente LTP inducida por tetanización asociada con despolarización postsináptica, sugiriendo que PKM ζ y la LTP

incrementan la transmisión sináptica a través de los mismos mecanismos (Ling et al; 2002).

Se ha examinado el sitio de la transmisión sináptica sobre el cual actúa PKM ζ para fortalecer la comunicación neuronal. Se describió que el efecto de PKM ζ sobre las CPSEm no se debe a un incremento en la conductancia del receptor AMPA, mas bien, se debe a un incremento en el número de receptores AMPA activos (Ling et al., 2006). Entre los mecanismos a través de los cuales PKM ζ modula la inserción de los receptores AMPA a la membrana postsináptica, se ha observado la participación del factor sensible a N-etilmaleimida (NSF). Durante la fase de mantenimiento de la LTP, PKM ζ regula el tráfico de las subunidades de dicho receptor a través de la interacción dependiente de NSF/GluR2 (Yao et al., 2008). Los resultados anteriores indican que PKM ζ incrementa la transmisión sináptica aumentando exclusivamente el número de receptores AMPA funcionales en la postsinapsis.

Aunque numerosos inhibidores de proteínas cinasas bloquean la inducción de la LTP cuando son aplicados en un marco de tiempo cercano a la tetanización, ninguno ha bloqueado la fase de mantenimiento de la LTP. Ling y colaboradores en el 2002 examinaron la LTP en su fase de mantenimiento, comparando el efecto de la inhibición de PKM ζ con la inhibición de otras cinasas (PKC, CaMKII y PKA). Los resultados mostraron que únicamente la inhibición de PKM ζ bloqueó el mantenimiento de la LTP, demostrando que la actividad de otras cinasas no es indispensable para la etapa tardía de la potenciación (Ling et al; 2002).

La potenciación sináptica durante su fase de mantenimiento usualmente se atribuye a un cambio en la morfología de la sinapsis (Yuste y Bonhoeffer; 2001), se ha observado que la polimerización de actina se correlaciona con la síntesis de PKM ζ , y esta a su vez con el persistente incremento en la transmisión sináptica durante la LTP (Kelly et al;2007) lo que sugiere que la eficiencia de PKM ζ puede mantener estados muy tardíos de la LTP, por lo tanto, el hecho de que una enzima persistentemente activa sea crítica para la fase de mantenimiento de la LTP, es de suma importancia para comprender los mecanismos del almacenamiento de la información a largo plazo.

Muslimov y colaboradores en el 2004 observaron una síntesis local de PKM ζ después de la inducción de la LTP en neuronas hipocampales. La localización dendrítica del ARNm de PKM ζ se ha postulado como un mecanismo para la especificidad de las sinapsis activadas, la cual puede ser considerada como una característica importante en la formación de persistentes trazos de memoria (Muslimov et al., 2004). Se ha observado que existen diversas proteínas cinasas que convergen para regular la síntesis de PKM ζ después de la inducción de la LTP. Muchas cinasas, incluidas las isoformas de PKC están inactivas inmediatamente después de su síntesis debido a que sus dominios se encuentran inicialmente en estados conformacionales inactivos, que de manera ineficiente se ligan a sus sustratos. Esas cinasas requieren ser fosforiladas por la proteína cinasa dependiente de fosfatidilinositol tipo 1 (PDK1) para su conversión a un estado conformacional activo (Newton, 2003). Se ha reportado que 1 hora después de la inducción de la LTP, PKM ζ recién sintetizada es fosforilada por PDK1, asegurando su máxima actividad para el sostenimiento de las respuestas neuronales (Kelly et al., 2007)

2.4.2 PKM zeta y conducta

Los datos anteriores muestran que la actividad de PKM ζ es necesaria para mantener un incremento en la eficiencia sináptica por periodos prolongados. La primera evidencia de que PKM ζ juega un papel en la formación de la memoria, fue descrita por Drier y colaboradores en el 2002, al evaluar el condicionamiento de evitación al olor en la *Drosophila*; ellos encontraron que la sobreexpresión de PKM ζ en una estrecha ventana de tiempo después del aprendizaje incrementa la retención de la memoria. De manera contraria, el bloqueo de la PKC isoforma atípica previene la formación de la memoria de largo plazo, sin afectar la formación de la memoria de corto plazo (Drier et al., 2002). Recientes investigaciones han enfocado su trabajo sobre el papel que juega PKM ζ en la memoria espacial, la cual es inicialmente codificada y almacenada en el hipocampo. Utilizando el paradigma de evitación al lugar (ver figura 13), se ha observado que animales tratados con ZIP (inhibidor específico de PKM ζ) exhiben claras deficiencias en la ejecución de dicha tarea

(Pastalkova et al., 2006). También se ha descrito que otras formas de memoria espacial de largo plazo son mantenidas por PKM ζ . La retención de la información requerida para la referencia espacial en el laberinto de agua y para la conducta condicionada en el laberinto radial de 8 brazos es afectada por la infusión intrahipocampal de ZIP (Serrano et al., 2008).

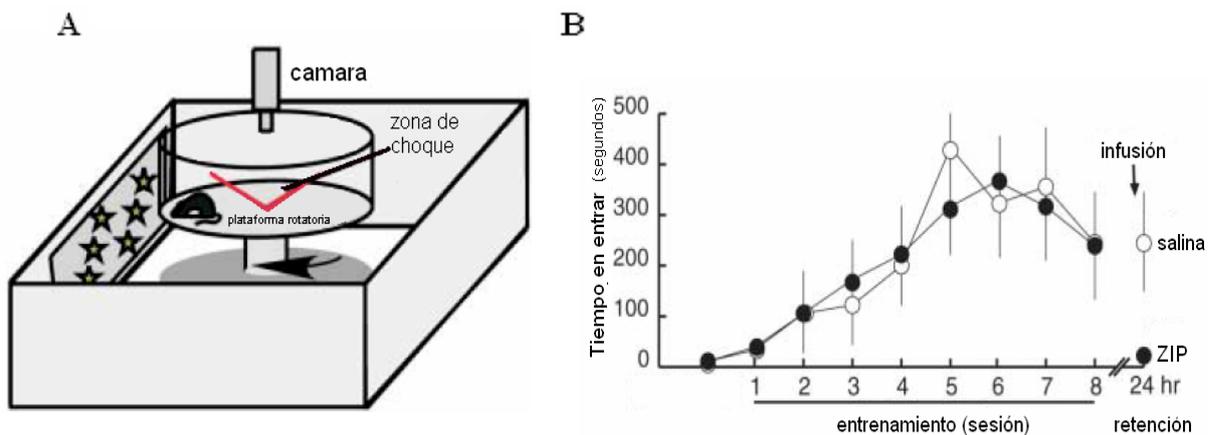


Figura 13. PKM ζ mantiene la memoria espacial de largo plazo en el hipocampo. A) el entrenamiento de la tarea de evitación al lugar consiste en la rotación de una plataforma, la cual contiene un sector de 60° (delineado en rojo) denominado zona de choque; pistas visuales son colocadas en la cámara de entrenamiento; los animales deben aprender a evitar la zona de choque con ayuda de las pistas visuales. B) Con el entrenamiento hay un incremento en el tiempo que pasan las ratas en entrar a la zona de choque como producto del aprendizaje; la infusión de ZIP 22 horas después de la adquisición produce un daño en la formación de la memoria de largo plazo, esto se ve reflejado en que los animales entran con mayor facilidad a la zona de choque. Círculos negros: animales tratados con ZIP. Círculos blancos: animales tratados con salina (modificado de Pastalkova et al., 2006)

De la misma forma, cuando es inhibida la actividad de PKM ζ en la amígdala basolateral, se observa una clara disminución en la retención de la memoria al miedo (Serrano et al., 2008), lo que demuestra que al impedir que PKM ζ ejerza sus acciones, se daña la retención de información en diferentes áreas del cerebro, por lo que la persistente actividad de PKM ζ se ha considerado como uno de los principales mecanismos moleculares que permiten la formación de trazos de memoria duraderos.

2.4.3 PKM zeta y la neocorteza

A pesar de que el hipocampo es una estructura relacionada con las memorias espaciales y la amígdala de las memorias asociadas con el miedo, la neocorteza es considerada como el almacén de las memorias de largo plazo en el cerebro de los mamíferos. Dudai y colaboradores en el 2007 describieron el papel que desempeña PKM ζ en el almacenamiento de información en la neocorteza utilizando el paradigma del condicionamiento aversivo a los sabores. El entrenamiento en el CAS produce una memoria de largo plazo de evitación al sabor, la cual se prolonga hasta por varias semanas. Como se observa en la figura 14, la microinfusión de ZIP en la corteza insular suprime la memoria gustativa cuando el agente es introducido 3 días, 1 mes e incluso hasta 3 meses después del entrenamiento (Shema et al., 2007; Shema et al., 2009). (Figura 14). Se ha reportado que el deterioro en la memoria persiste a través del tiempo, pues el daño se observa hasta 1 mes después del tratamiento con ZIP. Así mismo, se ha observado que entrenamiento intenso en el CAS no confiere inmunidad al efecto de ZIP sobre la memoria, y una vez suprimida por ZIP, la memoria del CAS puede ser readquirida de manera normal y rápidamente borrada por una nueva aplicación de ZIP en la CI (Shema et al., 2009). De manera importante, inyecciones de ZIP no tienen efecto anterógrado sobre la formación de la memoria de largo plazo cuando el fármaco es introducido 2 horas antes del entrenamiento

Lo anterior sugiere un papel fundamental de PKM ζ en los procesos mnémicos de larga duración en la neocorteza, favoreciendo el almacenamiento de la información por periodos prolongados.

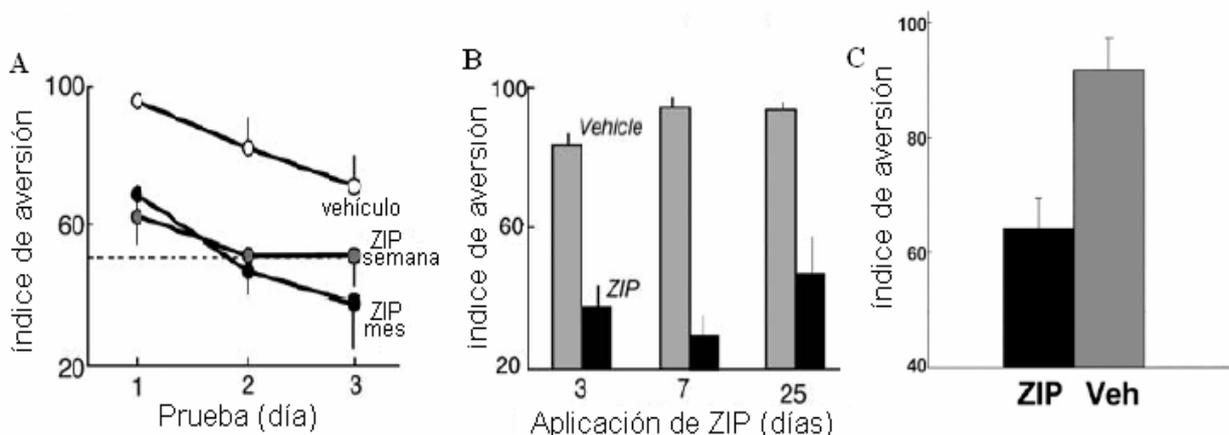


Figura 14. PKM ζ mantiene la memoria de largo plazo en la neocorteza. A) ZIP fue administrado 3 días después de la adquisición, la memoria fue probada una semana (círculo grises) y un mes después (círculo negros), en ambos grupos se observa un deterioro en el almacenamiento de la información en comparación al grupo tratado con el vehículo el cual mostraba una fuerte aversión al estímulo gustativo (círculos blancos). B) la microinfusión de ZIP en la corteza insular 3, 7 y 25 días después de la adquisición produce un severo daño en la formación de la memoria gustativa de largo plazo (barras negras) en comparación al grupo tratado con el vehículo (barras grises). C) ZIP o vehículo fue administrado 3 meses después de la sesión de adquisición, la memoria fue probada 2 días después; el grupo tratado con ZIP (barra negra) mostró baja aversión al estímulo condicionado en comparación al grupo tratado con el vehículo (barra gris), el cual mostraba fuerte aversión al sabor, demostrando que la actividad de PKM ζ es necesaria para el mantenimiento de la memoria de largo plazo en áreas neocorticales (Shema et al., 2007; Shema et al., 2009)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Estudiar los procesos a través de los cuales es adquirida y almacenada la información en el cerebro a partir del estudio de los mecanismos celulares que los subyacen, nos ofrece una aproximación para el entendimiento del comportamiento del ser humano. En estudios previos se demostró que la estimulación tetánica de la amígdala basolateral induce LTP en la corteza insular de las ratas adultas, y que ésta potenciación es dependiente de los receptores NMDA (Escobar et al., 1998a). Datos de nuestro laboratorio indican que el entrenamiento previo en el CAS modifica la posibilidad de inducir LTP en la corteza insular en ratas adultas *in vivo*, y dicho efecto es persistente ya que se mantiene hasta 120 horas después de concluida la fase conductual, sugiriendo una coincidencia en los mecanismos que subyacen a la LTP en la corteza insular y el CAS. En recientes investigaciones se ha mostrado que la inhibición de PKM ζ en la corteza insular, produce un deterioro en la retención del CAS, incluso cuando el fármaco es infundido hasta 3 meses después de la adquisición (Shema et al., 2007; Shema et al., 2009), lo que indica un papel

fundamental para PKM ζ en el almacenamiento de la información en áreas neocorticales por periodos prolongados de tiempo.

Teniendo en consideración los antecedentes, estudiar la participación de PKM ζ , implicada en el fortalecimiento de la transmisión sináptica por periodos prolongados y la observación del papel que juega dentro de la retención de diversos paradigmas de aprendizaje, ofrece una valiosa herramienta para estudiar los mecanismos homeostáticos que a nivel celular permiten experimentar cambios en la posibilidad de inducir subsecuente plasticidad sináptica en áreas neocorticales.

4. OBJETIVOS

Considerando los antecedentes, el presente proyecto se plantea los siguientes objetivos:

- Estudiar la participación de la proteína cinasa M zeta (PKM ζ) en la modulación que ejerce el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular de ratas adultas *in vivo*.
- Evaluar y discutir los resultados a la luz de las investigaciones en torno a las bases del almacenamiento de información en el sistema nervioso central.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 Sujetos

Para la presente investigación se utilizaron 28 ratas macho de la cepa Wistar, con pesos entre 360 y 380 g. Los sujetos experimentales tuvieron un periodo de habituación de una semana a las condiciones del bioterio. Se mantuvieron en cajas individuales de acrílico y estuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12/12h, a una temperatura promedio de 23° C; con comida y agua *ad limitum* (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario).

5.2. Diseño experimental.

El presente proyecto fue dividido en las siguientes fases experimentales:

Fase 1:

Investigaciones previas realizadas por Shema y colaboradores hacia el año 2007, reportan que la inhibición de PKM ζ en la CI produce daños en la retención de la memoria gustativa. Por lo tanto, el objetivo de la primera fase del presente estudio fue examinar el efecto de la inhibición de PKM ζ en la CI sobre el mantenimiento de la memoria de largo plazo del CAS. Con tal propósito, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

- **Grupo CAS+ZIP (n=10):** Las ratas fueron entrenadas en el CAS (de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 5.4) y 72 horas después de la sesión de adquisición recibieron una microinfusión intracortical bilateral de ZIP en la CI (ZIP/10nM/1 μ l/1min/hemisferio). Siete días después de la microinfusión se realizó la prueba de aversión (PA) (figura 15).
- **Grupo CAS+VEH (n=10):** Las ratas fueron entrenadas en el CAS (ver apartado 5.4) y 72 horas después de la sesión de adquisición recibieron una microinfusión intracortical bilateral de amortiguador de fosfatos como vehículo de ZIP en la CI (PBS/10nM/1 μ l/1min/hemisferio). Siete días después de la microinfusión se realizó la prueba de aversión (PA).

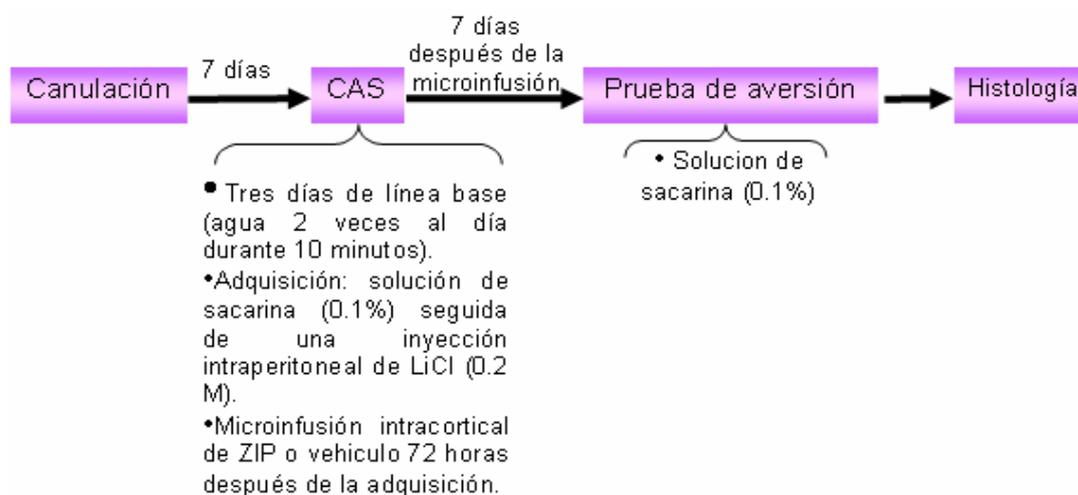


Figura 15. Diagrama de flujo correspondiente al diseño experimental de la fase 1

Fase 2:

Datos recientes de nuestro laboratorio muestran que el entrenamiento previo en el CAS bloquea la subsecuente inducción de LTP en la CI. Así, el objetivo de la segunda fase del presente estudio fue estudiar la participación de PKM ζ en la modulación que ejerce el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular de ratas adultas *in vivo*. Con tal propósito, los grupos experimentales fueron divididos de la siguiente manera:

- **Grupo CAS+ZIP+LTP (n=6):** Las ratas fueron entrenadas en el CAS (ver apartado 5.4) en ausencia de prueba de aversión con objeto de evitar las interferencias inherentes al proceso de evocación (Nader y Einarsson, 2010). Setenta y dos horas después de la sesión de adquisición recibieron una microinfusión intracortical bilateral del inhibidor selectivo de PKM ζ en la CI (ZIP/10nM/1 μ l/1min/hemisferio) y 48 horas más tarde fueron introducidas en la fase electrofisiológica (tal como se describe en el apartado 5.5) (figura 16).
- **Grupo CAS+VEH+LTP (n=7):** Las ratas fueron entrenadas en el CAS (apartado 5.4) en ausencia de la prueba de aversión. Setenta y dos horas después de la sesión de adquisición recibieron una microinfusión intracortical bilateral de amortiguador de fosfatos como vehículo de ZIP en la CI (PBS/1 μ l/1min/hemisferio). Cuarenta y ocho horas más tarde se les introdujo en la fase electrofisiológica (apartado 5.5).
- **Grupo PA+ZIP+LTP (n=6):** Las ratas fueron entrenadas en el CAS (apartado 5.4). Para este grupo se hicieron dos pruebas de aversión. La primera prueba (PA1) se realizó 48 horas después de la sesión de adquisición y 24 horas antes de la microinfusión de ZIP, con el objeto de corroborar la asociación del estímulo gustativo con la irritación gástrica. La segunda prueba de aversión (PA2) se hizo 24 horas después de la microinfusión de ZIP, con el propósito de verificar su efecto sobre

la memoria de largo plazo del CAS. Setenta y dos horas después de la sesión de adquisición recibieron una microinfusión intracortical bilateral de ZIP en la CI (ZIP/10nM/1 μ l/1min/hemisferio). Cuarenta y ocho horas después de la microinfusión fueron introducidas a la fase electrofisiológica.

- **Grupo CAS (n=10):** Los animales fueron entrenados en el CAS incluyendo la prueba de aversión, tal y como se describe en el apartado 5.4
- **Grupo LTP (n=7):** Los animales fueron introducidos directamente a la fase electrofisiológica sin ninguna manipulación previa (ver apartado 5.5)

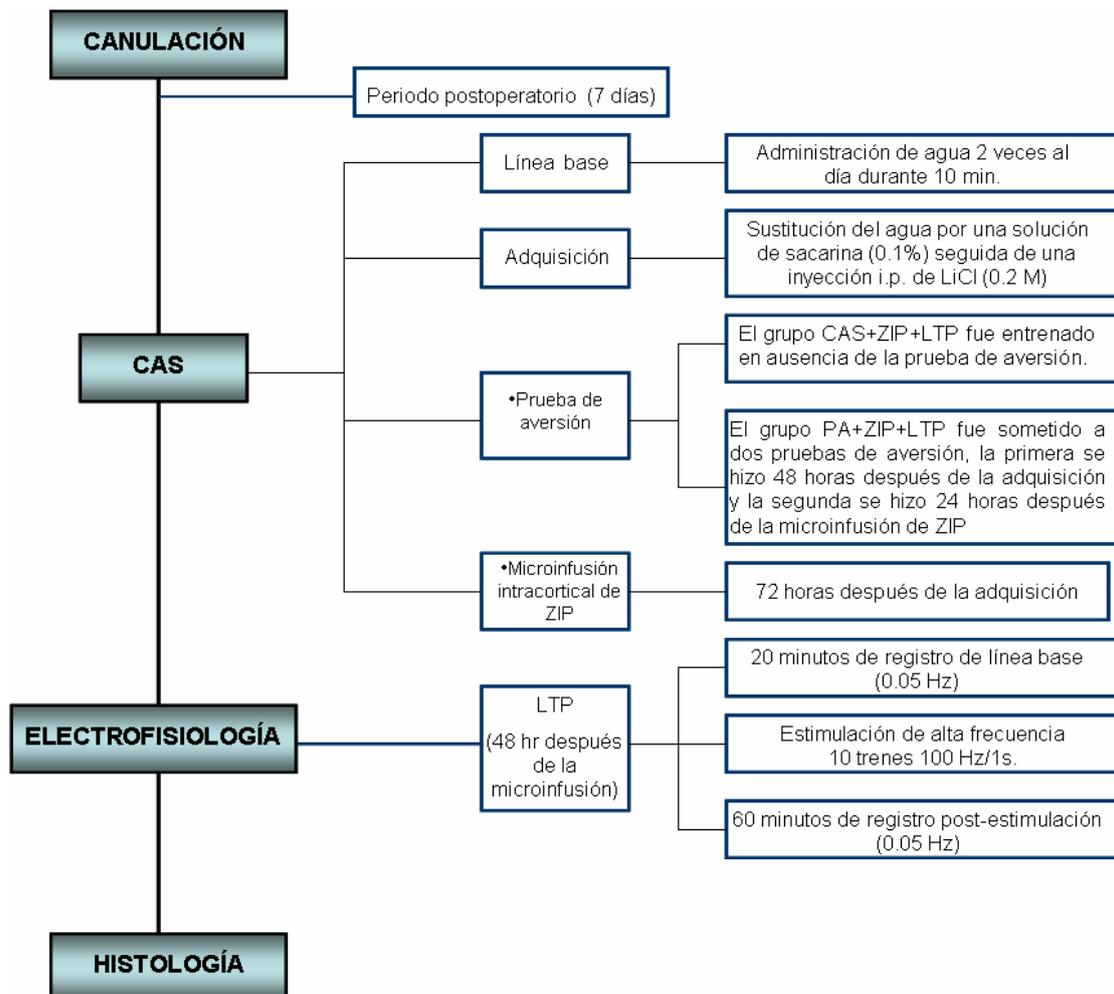


Figura 16. Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento experimental de la fase 2

5.3. Implantación de cánulas

El procesamiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales y consistió en la implantación bilateral de guías cánulas de acero inoxidable de 1 cm. de longitud y 0.022 pulgadas de calibre. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (50 mg/Kg. i.p.) Las coordenadas empleadas para corteza insular fueron AP= +1.2 mm; ML= +/-5.5 mm; DV= -2.0 mm (Paxinos et al., 1995). Los extremos de las guías cánula son colocadas 5 mm arriba de la CI bilateralmente; fueron fijadas al cráneo usando acrílico dental de secado rápido. Un estilete de acero inoxidable se colocó al interior de las cánulas con el fin de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de recuperación y entrenamiento. Los grupos canulados fueron infundidos intraparenquimamente en la región correspondiente a la CI en ausencia de anestésicos, 72 horas después del entrenamiento del CAS administró el inhibidor de PKM ζ , ZIP (Tocris, Bioscience) a una concentración de 10 nmol/ μ l. Para todos los grupos, las infusiones fueron administradas por microinyectores consistentes en agujas dentales de calibre 30. El microinyector fue introducido en la cánula previa remoción del estilete y se extendió 5 mm por debajo del extremo inferior de la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la CI (Figura 17). Los microinyectores están conectados mediante tubos de polietileno a jeringas Hamilton de 10.0 μ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicin, MA) a una velocidad de flujo de 1.0 μ l/1 minuto. Una vez inyectado el volumen total de la solución vehículo con fármaco, de acuerdo al protocolo experimental los microinyectores permanecieron durante un minuto más para asegurar la adecuada difusión de la solución en el tejido.

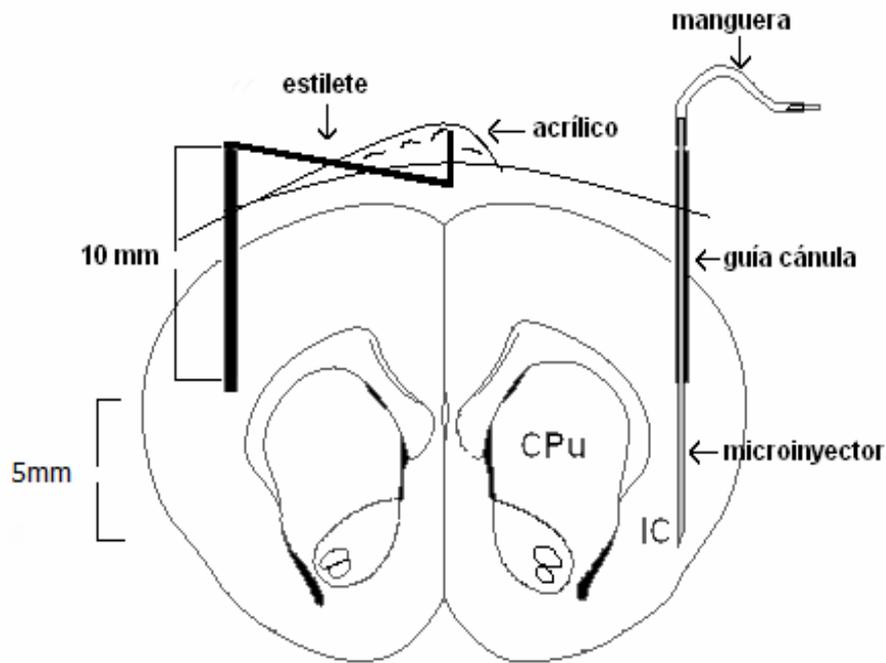


Figura 17. Esquema de un corte coronal que señala la posición de las guías cánulas utilizadas para la infusión de los fármacos en la corteza insular. CI = corteza insular, Cpu = Caudado-Putamen.

5.4. Condicionamiento aversivo a los sabores

Al inicio del entrenamiento en el condicionamiento aversivo a los sabores (CAS) las ratas fueron privadas de agua por 24 horas. Posteriormente fueron entrenadas para beber agua 2 veces al día durante 10 minutos por cada sesión de entrenamiento en un periodo de 3 días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. Los bebederos fueron contruidos con pipetas graduadas cubiertas con tapones de caucho horadados con boquillas de metal. En el cuarto día de entrenamiento, se realizó la sesión de adquisición, en la cuál los animales fueron privados de alimento y se substituyó el agua por un sabor novedoso, el cual fue una solución de sacarina 0.1% (Sigma WI). Después de 10 minutos de la presentación del estímulo novedoso, se administró una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (0.2M; 9.37 ml/Kg.) para inducir el malestar gástrico. Después de la sesión de adquisición, se restableció la línea base de consumo de agua durante dos días. Una vez restablecida la línea base de consumo de agua, el agua fue substituida nuevamente por la solución de sacarina durante la prueba de aversión. La disminución del consumo de

sacarina con respecto a la ingesta de agua durante la línea base fue usada como parámetro comparativo de la fuerza aversiva del CAS.

5.5. Electrofisiología

En los procedimientos quirúrgicos y electrofisiológicos, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50.0mg/Kg. IP), y posteriormente se suministraron inyecciones suplementarias del mismo (25.0mg/Kg.) en intervalos de una hora, con el fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. Para mantener la temperatura corporal se emplearon cojines homeotérmicos (Braintree Scientific, INC). Los potenciales de campo evocados en la corteza insular fueron registrados unilateralmente con un electrodo monopolar de acero inoxidable (diámetro 0.0005”, Medewire, Chicago, IL), colocado en las coordenadas de la corteza insular: AP +1.2mm, ML +5.5mm, DV-5.5mm (Paxinos y Watson, 1995). Las respuestas fueron evocadas unilateralmente a través de la estimulación directa del núcleo basolateral amigdalino, en las coordenadas: AP -2.8mm, ML -5.0mm, DV -8.5mm (Paxinos y Watson, 1995) (Figura 18), con un electrodo bipolar trenzado de acero inoxidable (diámetro 0.0005”, Medewire, Chicago, IL). La estimulación (pulsos monofásicos de 50-70 μ A y de 0.1-0.25 mseg. de duración) fue suministrada por un estimulador Grass S48. Las respuestas evocadas fueron registradas con una unidad de aislamiento (PSIU6), la cual envía la señal a un amplificador Grass P5. Posteriormente la señal fue digitalizada para su almacenamiento y análisis en una computadora provista del software “Data Wave”. Estímulos de baja frecuencia fueron evocados (cada 20 segundos, 0.05Hz) durante los 20 minutos que constituyen la línea base. Las señales electroencefalográficas fueron monitoreadas durante todo el registro. Posterior a la línea base, se aplicaron 10 trenes de estimulación con duración de 1 segundo cada uno, a una frecuencia de 100 Hz, con un intervalo intertren de 20 segundos con el fin de inducir la potenciación a largo plazo (LTP). Tras la estimulación de alta frecuencia, las respuestas evocadas fueron registradas durante una hora más, con el propósito de observar los cambios en la pendiente de los PPSEs.

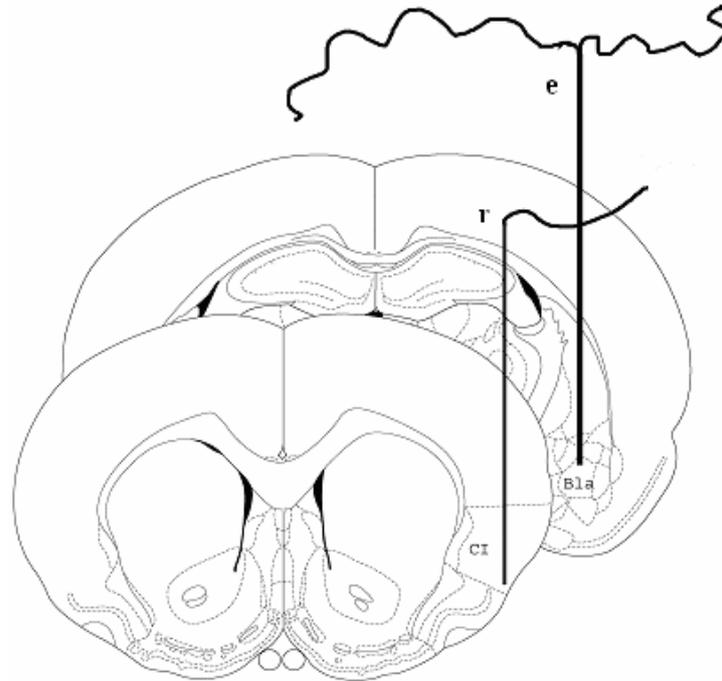


Figura 18. Ubicación de los electrodos. En este esquema se muestran los sitios de colocación de los electrodos de registro (r) y estimulación (e). Abreviaciones: Bla, basolateral amigdalino; CI, corteza insular.

5.6. Análisis histológico de Nissl

Una vez concluida la fase conductual y electrofisiológica del experimento, los cerebros de los animales fueron analizados a través de la técnica histológica de Nissl con el fin de observar la ubicación exacta de los electrodos. Los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis del anestésico pentobarbital. Se efectuó una perfusión intracardial de los sujetos canulados con solución salina al 0.9% seguida por una segunda perfusión con solución fijadora de paraformaldeído 4.0% / glutaraldeído 0.1% en PBS pH 7.4. Los cerebros fueron extraídos y almacenados para su postfijación en paraformaldeído 4.0% / glutaraldeído 0.1% durante 24 horas a 4°C. Transcurrido este periodo, fueron almacenados en una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta que alcanzaron una densidad mayor a la de la solución. Solo entonces los cerebros fueron congelados y rebanados en cortes coronales de 40 µm. Las muestras fueron teñidas con violeta de cresilo y examinadas en un microscopio de luz, con el fin de verificar la posición de la punta del microinyector y del microelectrodo. Los cortes se montaron en portaobjetos de cristal bañados de gelatina y cromoalúmina.

5.7. Análisis de datos

Durante los experimentos conductuales se midió el consumo de sacarina con respecto a la línea base de consumo. El análisis de datos que se obtuvieron se efectuó a través del ANOVA factorial. Durante los experimentos electrofisiológicos se midieron los cambios de las respuestas evocadas en la CI, mediante la obtención de la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) de campo, para ello se empleó el ANOVA por medidas repetidas. En ambos casos se empleó la prueba post-hoc de Fisher. Los resultados se expresan como media (\bar{x}) y error estándar de la media (E.E.M).

6. RESULTADOS FASE 1

6.1 Conductuales

Línea base y adquisición

La fase 1 del presente estudio tuvo como objetivo corroborar los datos obtenidos por Shema et al, en el 2007, quienes describieron la participación de PKM ζ en el mantenimiento de la memoria de largo plazo del CAS en la CI. Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los grupos CAS+ZIP y CAS+VEH durante el consumo basal de agua, ni durante el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS. El promedio de consumo de agua (expresados en $\bar{x} \pm$ E.E.M) durante la línea base fue de 14.94 ± 0.326 ml para el grupo CAS+ZIP y de 15.50 ± 0.25 ml para el grupo CAS+VEH. Durante la sesión de adquisición del CAS, el promedio de consumo de sacarina para el grupo CAS+ZIP fue de 15.00 ± 0.36 ml y para el grupo CAS+VEH fue de 14.50 ± 0.22 ml.

Prueba de aversión

Los resultados obtenidos en la prueba de aversión, realizada siete días después de la microinfusión de ZIP o del vehículo, muestran un decremento en el consumo de sacarina como producto del aprendizaje aversivo en el grupo CAS+VEH (grupo entrenado en el CAS y microinfundido con el vehículo en la CI 72 horas después de la adquisición) (figura 19). Asimismo, los datos

muestran que el grupo CAS+ZIP (grupo entrenado en el CAS y microinfundido con ZIP en la CI 72 horas después de la adquisición) presentó una clara deficiencia en la retención de la memoria gustativa, indicando que PKM ζ es esencial para el mantenimiento de la memoria de largo plazo del CAS. El ANOVA factorial y el análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher revelan diferencias significativas entre los grupos CAS+ZIP y CAS+VEH durante la prueba de aversión $F(1,18) = 387.69, p < 0.001$. Estos datos muestran que la actividad de PKM ζ en la CI es fundamental para la persistencia de la memoria de aversión al sabor, pues su inhibición produce un daño en la retención de dicha información.

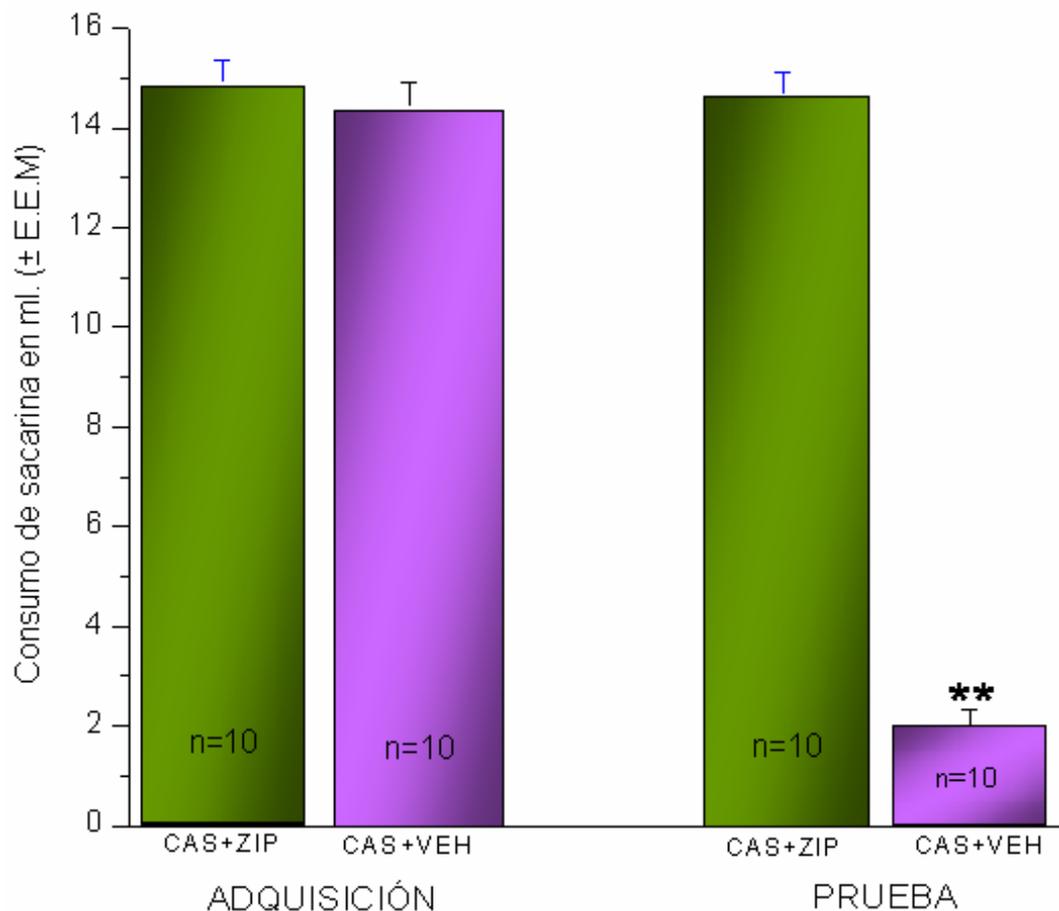


Figura 19. La inhibición de PKM ζ en la CI causa una deficiencia en el mantenimiento de la memoria de largo plazo del CAS. En esta gráfica se observa el consumo de sacarina en mililitros (media \pm error estándar de la media) durante la sesión de adquisición y la prueba de aversión (realizada 7 días después de la microinfusión). Los datos muestran que la inhibición de PKM ζ en la CI 72 horas después de la adquisición del CAS produce un deterioro en el mantenimiento de la memoria gustativa, tal como se observa en el grupo CAS+ZIP, el cual presentó un consumo de sacarina similar durante la sesión de adquisición y durante la prueba de aversión, en comparación al grupo CAS+VEH, el cual disminuyó su consumo de sacarina durante la prueba de aversión, como producto del aprendizaje aversivo. Es así como se corroboran los datos que indican que PKM ζ es necesaria para la persistencia de la memoria de largo plazo. **= $P < 0.001$

7. RESULTADOS FASE 2

7.1 Conductuales

Línea base y adquisición

Los resultados conductuales de la fase 2 revelaron que no existen diferencias significativas entre los grupos CAS y PA+ZIP+LTP durante el consumo basal de agua. Como se observa en la figura 20, tampoco existieron diferencias significativas en el consumo de la solución de sacarina durante la sesión de adquisición del CAS. El promedio de consumo de agua (expresados en $\bar{x} \pm$ E.E.M) durante la línea base del grupo CAS fue de 16.05 ± 0.50 ml y para el grupo PA+ZIP+LTP fue de 16.66 ± 0.54 ml. Durante la sesión de adquisición del CAS, el promedio de consumo de sacarina fue de 15.70 ± 0.30 ml para el grupo CAS y de 16.16 ± 0.30 ml para el grupo PA+ZIP+LTP

Prueba de aversión

Los datos obtenidos durante la prueba de aversión del grupo CAS (realizada 72 horas después de la sesión de adquisición) muestran un decremento en el consumo de sacarina como producto del aprendizaje aversivo (figura 20). Para el grupo PA+ZIP+LTP se hicieron dos pruebas de aversión. La primera prueba (PA+ZIP+LTP1) se realizó 48 horas después de la sesión de adquisición y 24 horas antes de la microinfusión de ZIP. EL objetivo de la primera prueba de aversión fue corroborar la asociación del estímulo gustativo con el malestar gástrico. La segunda prueba de aversión (PA+ZIP+LTP) se realizó 24 horas después de la microinfusión de de ZIP, con el propósito de verificar su efecto sobre la memoria de largo plazo del CAS. Durante la primera prueba de aversión del grupo PA+ZIP+LTP se observa un decremento en el consumo de sacarina con respecto a la línea base como producto del aprendizaje en el CAS. Por otra parte, la segunda prueba de aversión del grupo PA+ZIP+LTP muestra que 24 horas después de la microinfusión de ZIP se produce un deterioro en la retención de la memoria de largo plazo del CAS, tal y como se observa en la figura 20. El ANOVA factorial reveló diferencias significativas entre los grupos CAS y PA+ZIP+LTP $F_{(1,14)} = 429.26$, $p < 0.001$. Además, el análisis post-hoc empleando la prueba de Fisher mostró que no existen

diferencias significativas en el consumo de sacarina durante la prueba de aversión entre el grupo CAS y la primera prueba de aversión del grupo PA+ZIP+LTP. Por el contrario, ambos grupos presentan diferencias significativas con respecto a la segunda prueba de aversión del grupo PA+ZIP+LTP ($p < 0.001$). Los datos anteriores muestran que la actividad de PKM ζ en la CI es necesaria para el almacenamiento de la memoria gustativa.

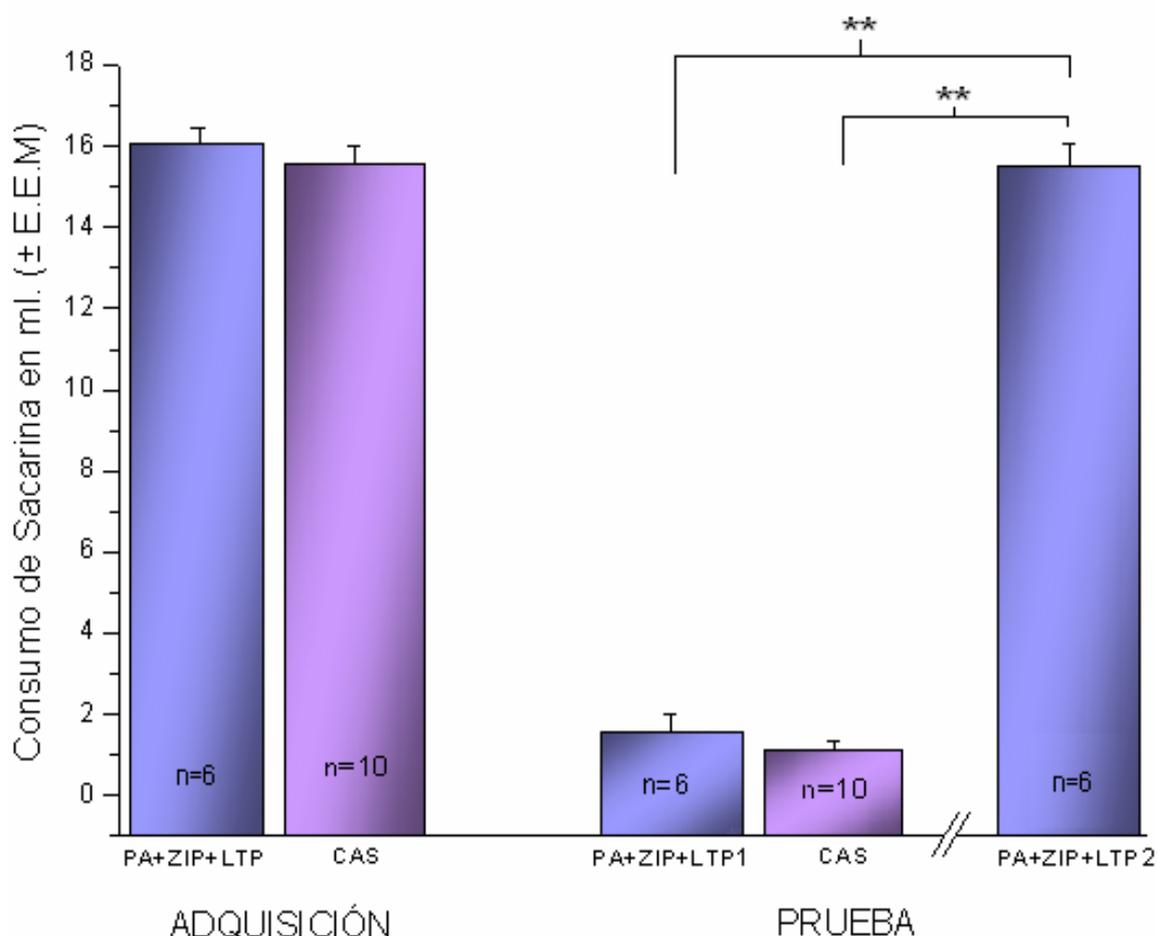


Figura 20. PKM ζ en la CI es necesaria para la persistencia de la memoria de largo plazo del CAS. En esta gráfica se observa el consumo de sacarina en mililitros (media \pm error estándar de la media) durante la sesión de adquisición y la prueba de aversión. Para el grupo CAS la prueba de aversión se realizó 48 horas después de la adquisición. Para el grupo PA+ZIP+LTP se hicieron dos pruebas de aversión, la primera de ellas (PA+ZIP+LTP1) se hizo 48 horas después de la adquisición y 24 horas antes de la microinfusión de ZIP con el fin de corroborar la asociación entre el estímulo gustativo y la irritación gástrica. La segunda prueba (PA+ZIP+LTP2) se hizo 24 horas después de la microinfusión de ZIP con el propósito de verificar su efecto sobre la memoria de largo plazo del CAS. ** = $P < 0.001$

7.2 Electrofisiológicos

Las respuestas evocadas en la CI fueron medidas a través de la obtención de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) de campo. Los potenciales fueron evocados por pulsos monofásicos de 50-70 μ A y 0.25 ms de duración, iniciando de 2-3 ms post-estimulación, presentando su valle entre los 7-9 ms. La amplitud promedio de los PPSEs de campo fue de 0.57 ± 0.005 mV y con una pendiente promedio de 0.21 ± 0.003 mV.

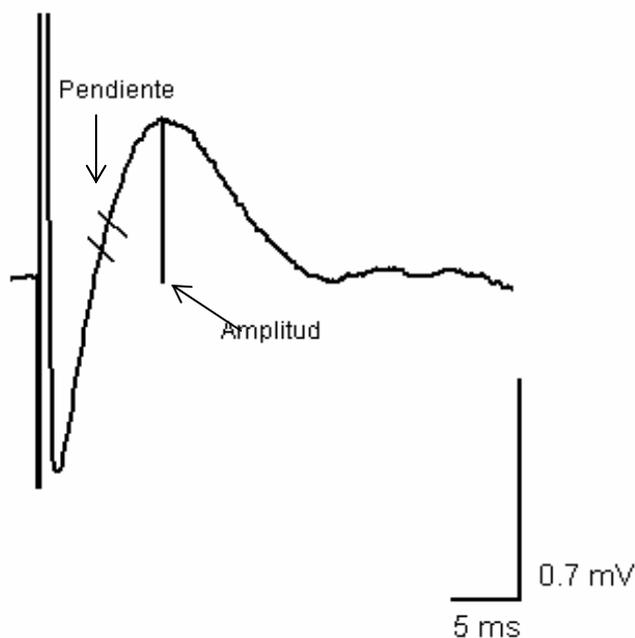


Figura 21. Esquema representativo de la señal registrada

En el análisis estadístico se comparó la pendiente de los PPSEs de campo medidos después de la aplicación de los trenes de alta frecuencia (ver apartado 5.5) en todos los grupos. Los grupos mostraron diferencias significativas cuando se utilizó el ANOVA de medidas repetidas $F_{(3,22)} = 87.80$, $P < 0.001$

En la figura 22 se muestra la pendiente de los PPSEs de campo medidos en la vía Bla-CI del grupo LTP, el cual fue introducido directamente a la fase electrofisiológica (ver apartado 5.5). En esta investigación, como anteriormente se ha reportado (Escobar et al., 1998a; Jones et al., 1999) se muestra que diez trenes de estimulación de alta frecuencia induce LTP en la

vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino (BLa) hacia la corteza insular de ratas adultas *in vivo*.

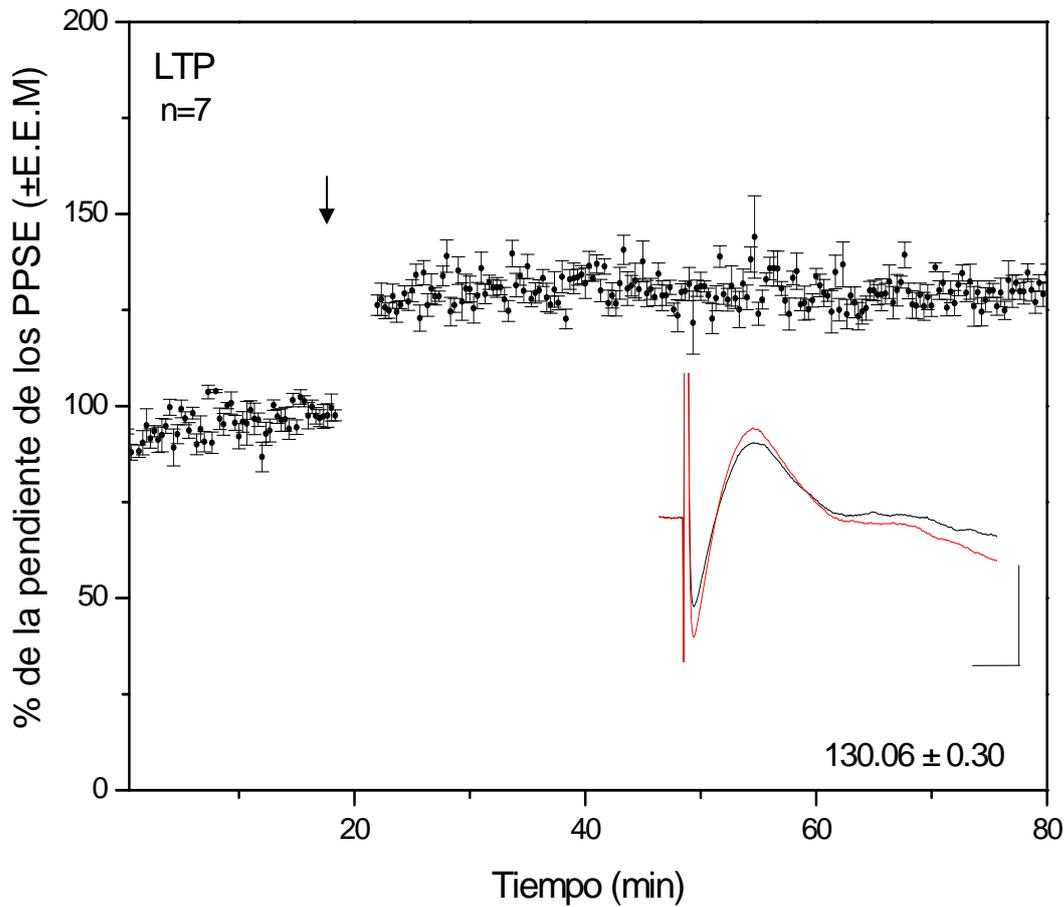


Figura 22. Inducción de LTP en la CI. En esta gráfica se muestra la media \pm error estándar del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base, registrados en la vía Bla-CI del grupo LTP. En la parte inferior derecha de la gráfica se observan los potenciales representativos de la CI, antes y después de la inducción de la LTP, así como el porcentaje de los PPSEs después de la aplicación de los trenes de alta frecuencia. La flecha negra indica la aplicación de los trenes de alta frecuencia. Barra de escala: 5ms, 0.7 mV

En la figura 23 se puede observar la pendiente del PPSE de campo medidos en la vía Bla-CI del grupo CAS+VEH+LTP. En esta gráfica se observa el efecto metaplástico producido por el aprendizaje, ya que el entrenamiento previo en el CAS inhibe la posibilidad de inducir subsecuente LTP en la vía Bla-CI, como parte de un mecanismo homeostático. En este sentido, el análisis post-hoc mostró que el grupo CAS+VEH+LTP (el cual no presentó LTP en respuesta a la estimulación de alta frecuencia) tiene diferencias significativas con el grupo

LTP (el cual si presentó LTP en respuesta a la estimulación de alta frecuencia) ($p < 0.001$).

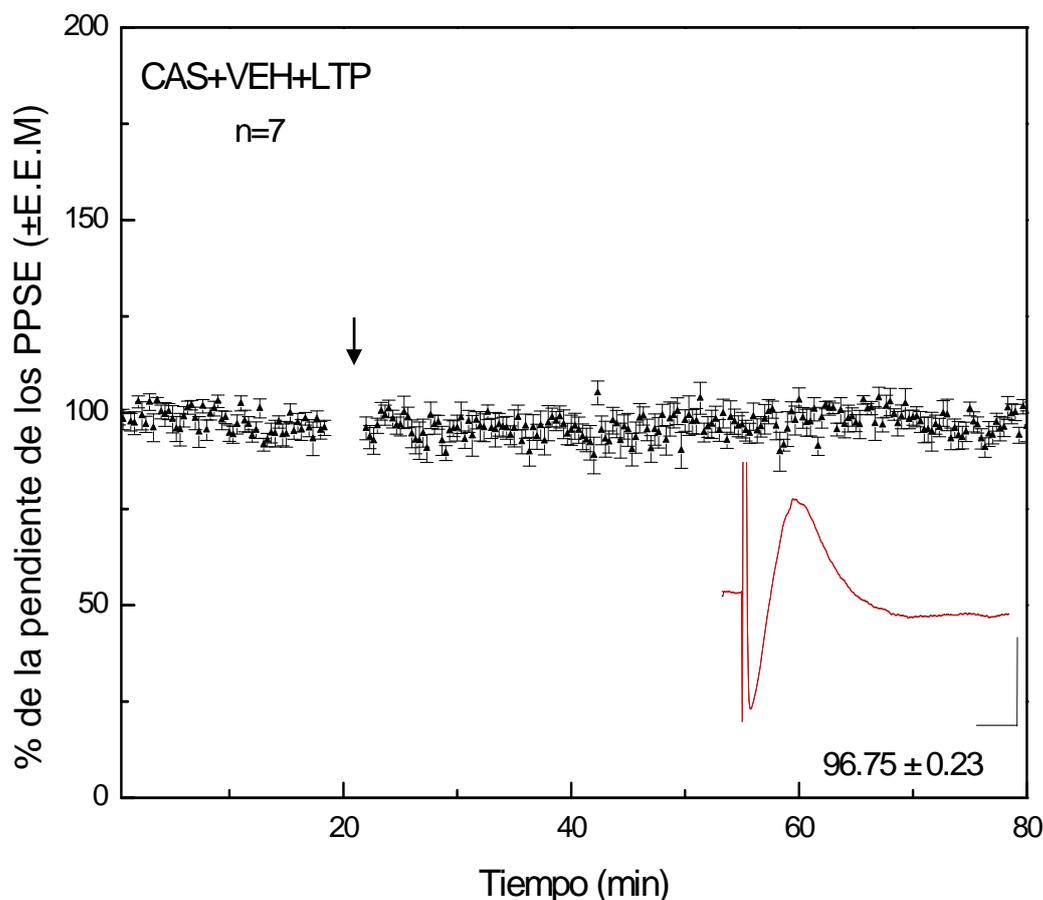


Figura 23. Efecto del entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía BLA-CI. En esta gráfica se muestra la media \pm error estándar del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base, registrados en la vía Bla-CI del grupo CAS+VEH+LTP. En la parte inferior derecha de la gráfica se observan los potenciales representativos de la CI, antes y después de la inducción de la LTP, así como el porcentaje de los PPSEs después de la aplicación de los trenes de alta frecuencia. La flecha negra indica la aplicación de los trenes de alta frecuencia. Barra de escala: 5ms, 0.7 mV

En la figura 24 se puede observar la pendiente del PPSE de campo medidos en la vía Bla-CI del grupo CAS+ZIP+LTP. Este grupo fue entrenado en el CAS en ausencia de la prueba de aversión, con el objetivo de evitar las interferencias producidas por el proceso de evocación. Setenta y dos horas posteriores a la adquisición se realizó la microinfusión del ZIP. Cuarenta y ocho horas más tarde se les indujo LTP en la CI. Como observamos en la gráfica, al inhibir PKM ζ en la CI, el efecto metaplástico producido por el entrenamiento previo en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía Bla-CI es revertido.

A este respecto, la prueba post-hoc de Fisher mostró que los grupos CAS+ZIP+LTP y LTP (los cuales si presentaron potenciación de largo plazo) no mostraron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, cada uno de los grupos mencionados anteriormente presentaron diferencias significativas con respecto al grupo CAS+VEH+LTP ($p < 0.001$).

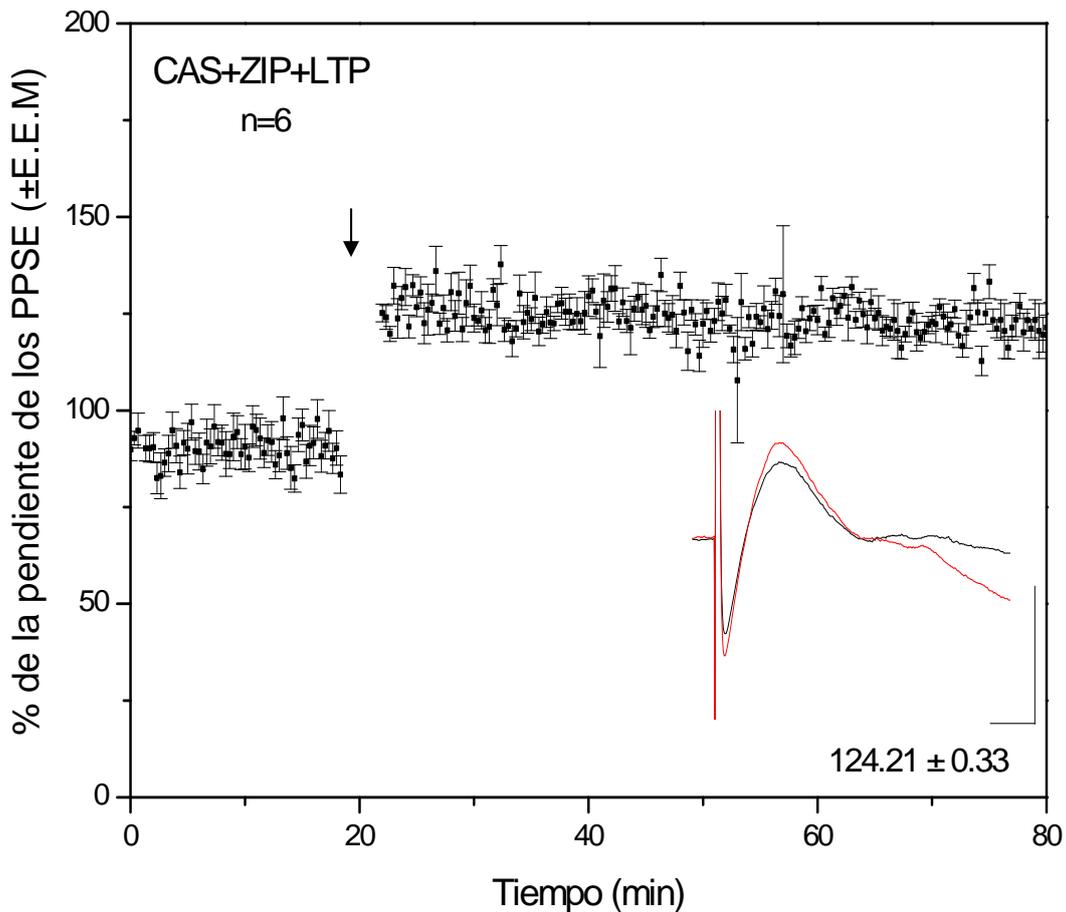


Figura 24. La inhibición de PKM ζ posterior al entrenamiento del CAS permite la subsecuente inducción de LTP en la vía BLA-CI. En esta gráfica se muestra la media \pm error estándar del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base, registrados en la vía BLA-CI del grupo CAS+VEH+LTP. En la parte inferior derecha de la gráfica se observan los potenciales representativos de la CI, antes y después de la inducción de la LTP, así como el porcentaje de los PPSEs después de la aplicación de los trenes de alta frecuencia. La flecha negra indica la aplicación de los trenes de alta frecuencia. Barra de escala: 5ms, 0.7 mV

En la figura 25 se muestra la pendiente del PPSE de campo medidos en la vía BLA-CI del grupo PA+ZIP+LTP. Este grupo entrenado en el CAS fue sometido a dos pruebas de aversión. La primera se realizó 48 horas después de la adquisición con el objetivo de verificar que los animales aprendieran la

asociación entre el estímulo gustativo y el estímulo aversivo. La segunda prueba de aversión, realizada 24 horas después de la microinfusión de ZIP, tuvo como propósito corroborar la supresión de la memoria de largo plazo del CAS. Los datos obtenidos en este grupo muestran que la actividad de PKM ζ es necesaria para la persistencia del bloqueo que el entrenamiento en el CAS produce sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía Bla-CI, de manera que, su inhibición permite la expresión de LTP en dicha vía. El análisis post-hoc de Fisher mostró que los grupos LTP, CAS+ZIP+LTP y PA+ZIP+LTP no presentaron diferencias significativas entre ellos. Aunado a lo anterior, cada uno de los grupos mencionados presentaron diferencias significativas con respecto al grupo CAS+VEH+LTP ($p < 0.001$).

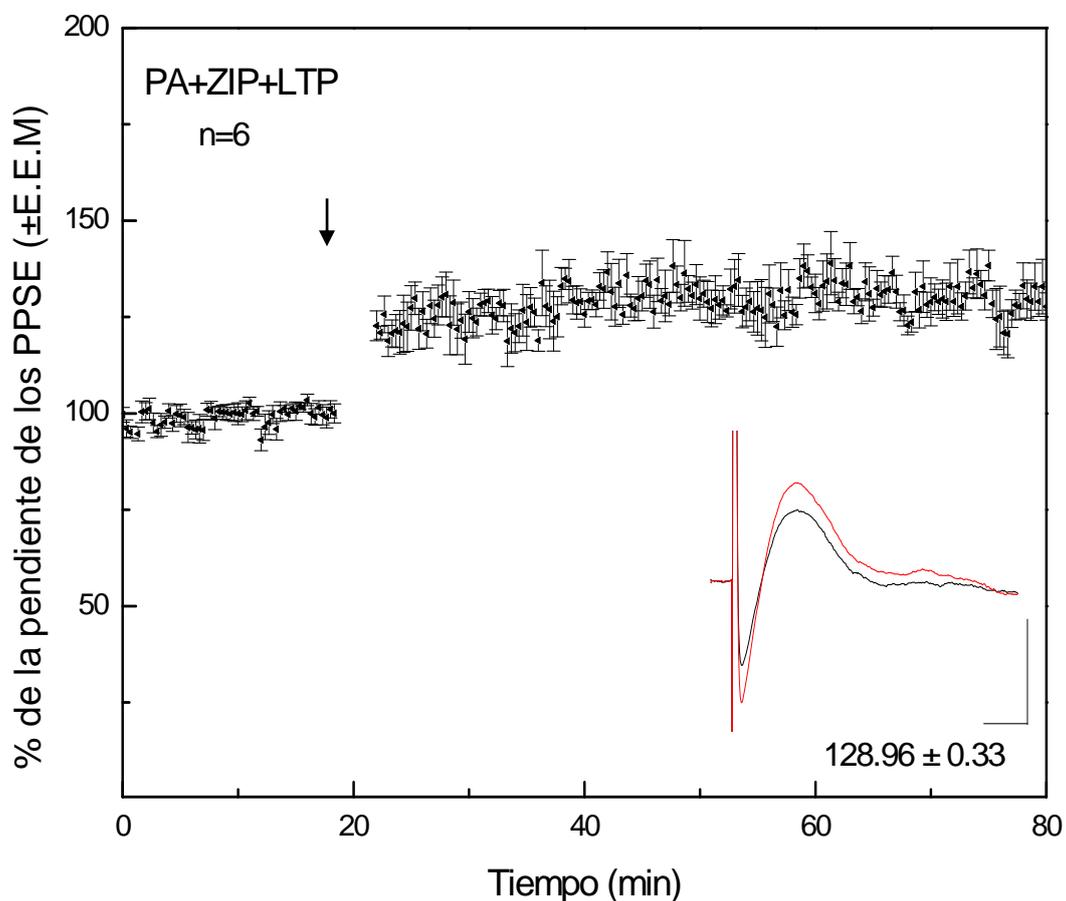


Figura 25. La inhibición de PKM ζ posterior al entrenamiento del CAS permite la subsecuente inducción de LTP en la vía BLA-CI. En esta gráfica se muestra la media \pm error estándar del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base, registrados en la vía Bla-CI del grupo CAS+VEH+LTP. En la parte inferior derecha de la gráfica se observan los potenciales representativos de la CI, antes y después de la inducción de la LTP, así como el porcentaje de los PPSEs después de la aplicación de los trenes de alta frecuencia. La flecha negra indica la aplicación de los trenes de alta frecuencia. Barra de escala: 5ms, 0.7 mV

Como resumen, en la figura 26 se muestra una vista comparativa del porcentaje de la pendiente de los PPSEs de campo de los grupos LTP, CAS+VEH+LTP, CAS+ZIP+LTP y PA+ZIP+LTP.

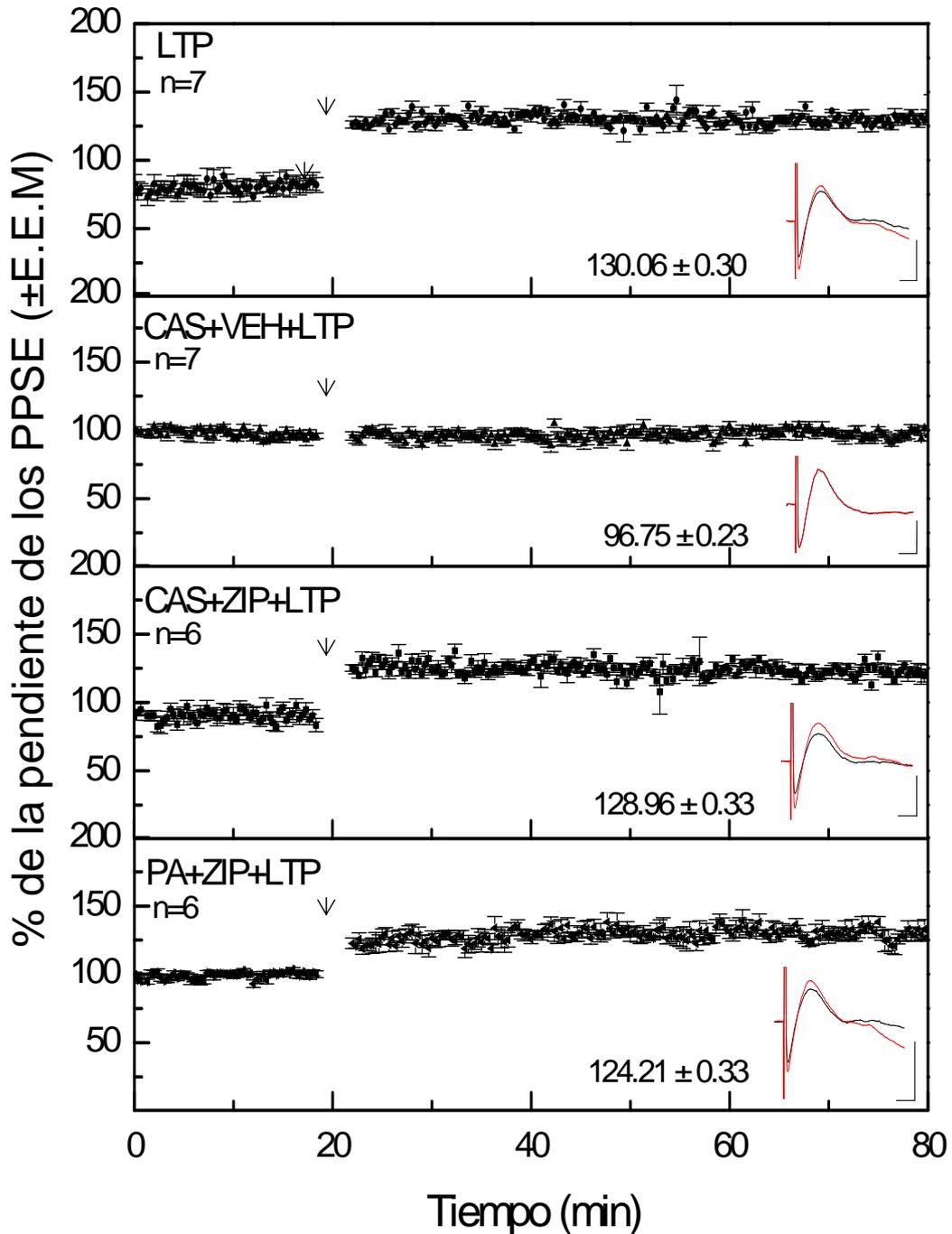


Figura 26. Sumario de la fase electrofisiológica. Esta gráfica muestra la media \pm error estándar del porcentaje de la pendiente de los PPSEs con respecto a la línea base, registrados en la vía Bla-CI de todos los grupos introducidos a la fase electrofisiológica. En la parte inferior derecha de la gráfica se observan los potenciales representativos de la CI, antes y después de la inducción de la LTP, así como el porcentaje de los PPSEs después de la aplicación de los trenes de alta frecuencia. Las flechas negras indican la aplicación de los trenes de alta frecuencia. Barra de escala: 5ms, 0.7 mV

8. Resultados histológicos.

El análisis histológico de Nissl mostró que la guía cánula se encontraba correctamente ubicada en la CI en todas las ratas utilizadas en el presente estudio. Los animales en los cuales la cánula no se encontraba ubicada en la CI fueron descartados de la muestra de cada uno de los grupos.

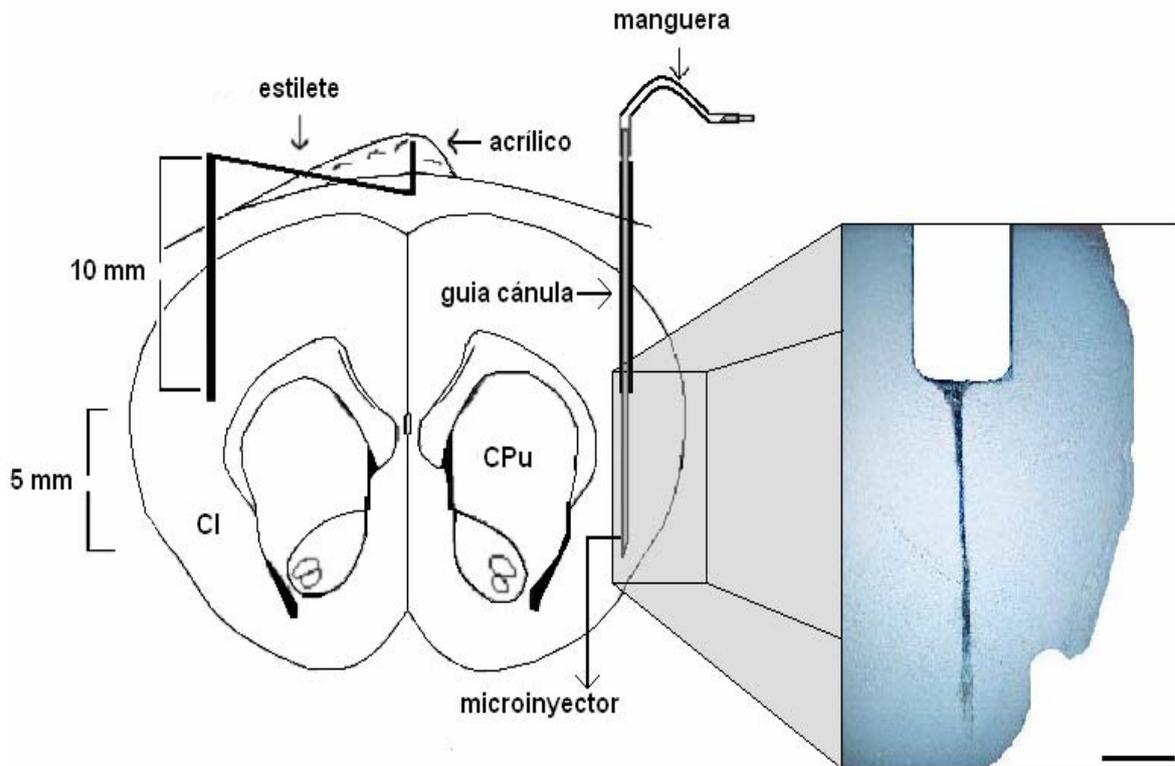


Figura 27. Esquema representativo de un corte coronal que señala la posición de las guías cánulas. En la imagen se puede apreciar que el microinyector se ubica correctamente en la CI. Barra de escala 0.5 mm.

Asimismo, el análisis histológico de Nissl mostró que tanto el electrodo de estimulación como el de registro estuvieron colocados correctamente en el núcleo BLa y en la CI respectivamente, en todas las ratas que fueron introducidas a la fase electrofisiológica.

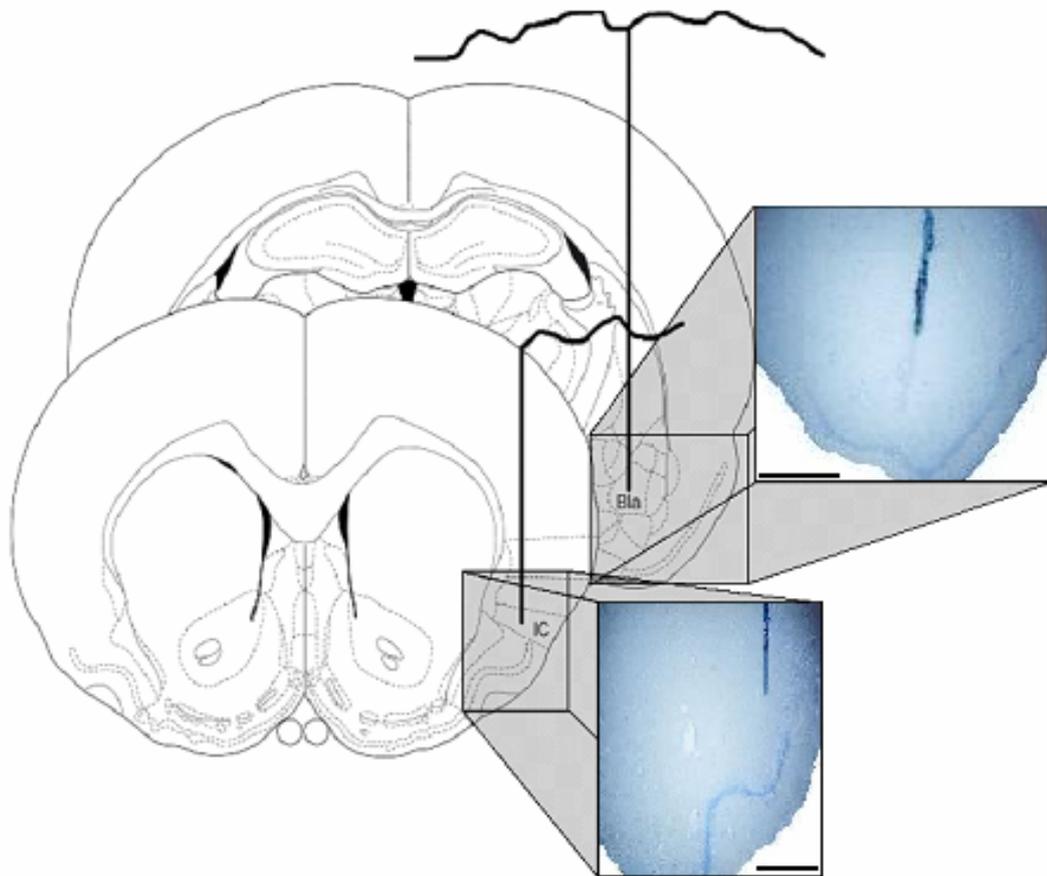


Figura 28. Esquema representativo de un corte coronal que muestra la ubicación de los electrodos. Se puede apreciar la ubicación del electrodo de registro en la corteza insular agranular, así como el electrodo de estimulación en el área del núcleo basolateral amigdalino. Barra de escala 1mm.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Cuando se habla de memoria comúnmente se asocia con el pasado, no obstante, la memoria permite responder a los acontecimientos presentes e influye en la capacidad de responder a futuros estímulos, al codificar experiencias por periodos duraderos, con la habilidad de ser actualizados.

Las investigaciones en torno al estudio de las bases celulares del aprendizaje y la memoria, han identificado algunas moléculas esenciales que intervienen en los procesos de adquisición y consolidación de la información (Lamprecht y LeDoux, 2004). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los procesos involucrados en la permanencia de la memoria de largo plazo. En este sentido, investigaciones recientes han propuesto a la proteína cinasa M zeta (PKM ζ) como un regulador esencial para el mantenimiento de trazos de memoria por periodos prolongados (Pastalkova et al., 2006; Shema et al., 2007; Shema et al., 2009). La proteína PKM ζ carece de la autoinhibición del dominio regulador, propiedad que le permite fosforilar a sus sustratos sin la necesidad de ser activada por segundos mensajeros. Así, PKM ζ resulta fundamental para la permanencia tanto de la fase tardía de la LTP como de la memoria de largo plazo del CAS.

Por ello, la primera fase de este estudio evaluó la participación de PKM ζ en el mantenimiento de la memoria de largo plazo del CAS en la CI. En este sentido observamos que la inhibición de PKM ζ en la CI 72 horas después de la adquisición del CAS produce un daño en la retención de la memoria de aversión al sabor, probada 7 días después de la microinfusión de ZIP (ZIP/10nM/1 μ l/1min/hemisferio). Los resultados obtenidos en dicha fase concuerdan con los datos observados previamente por Shema y colaboradores en el 2007, sugiriendo que PKM ζ es necesaria para la persistencia de los trazos mnémicos.

Desde su descubrimiento en 1973 por Bliss y Lomo, la LTP de la transmisión sináptica excitatoria ha sido uno de los principales fenómenos celulares que

ha contribuido sustancialmente al estudio de los procesos de aprendizaje y memoria (Bliss y Lomo., 1973). Los cambios en la eficiencia sináptica producidos durante la LTP también han sido observados como consecuencia del aprendizaje (McKernan y Shinnick-Gallagher., 1997; Rogan et al., 1997; Rioult-Pedotti et al., 1998; Whitlock et al., 2006). Así, se considera que los organismos almacenan información a través de cambios dependientes de la actividad en las conexiones nerviosas. Actualmente sabemos que la historia de actividad de las neuronas modifica la manera en que estas responderán a futuros estímulos, dichos cambios forman parte de una serie de mecanismos llamados plasticidad homeostática, entre los que destaca la metaplasticidad. La metaplasticidad es un cambio en la posibilidad de inducir subsecuente plasticidad sináptica (Abraham y Bear, 1996). Un efecto metaplástico se observa cuando la conducta modifica la posibilidad de inducir subsecuente LTP (Quinlan et al., 2004), asimismo, cuando la inducción previa de LTP es capaz de modificar la conducta. En este sentido, investigaciones realizadas en nuestro laboratorio muestran que la inducción de LTP en la proyección BLA-CI precedente al entrenamiento en el CAS, aumenta la retención de dicho aprendizaje (Escobar et al., 2000). Se observó asimismo que el entrenamiento en el CAS bloquea la subsecuente inducción de LTP en la vía BLA-CI por periodos prolongados.

En la fase 2 de nuestra investigación observamos que la proteína PKM ζ es necesaria para la persistencia del bloqueo que el CAS ejerce sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular en ratas adultas in vivo, ya que al inhibirla, se puede inducir el fenómeno en dicha vía. Los datos anteriores indican la existencia de una interacción entre el incremento en la eficiencia sináptica producido durante la LTP y las modificaciones neuronales asociadas con el aprendizaje, sugiriendo una convergencia en los mecanismos involucrados en ambas expresiones de plasticidad sináptica. Al respecto, el presente estudio sugiere que PKM ζ forma parte de los mecanismos moleculares necesarios para la permanencia de fenómenos metaplásticos en áreas neocorticales.

Entre los mecanismos moleculares relacionados con la metaplasticidad, se ha observado un cambio en las proporciones de la subunidad NR2A y NR2B del receptor a glutamato NMDA, el cual persiste hasta 48 horas después del entrenamiento en una tarea conductual (Quinlan et al., 2004). Como se mencionó en líneas anteriores, investigaciones de nuestro laboratorio muestran que el entrenamiento en el CAS bloquea la posibilidad de inducir subsecuente LTP en la vía BLa-CI, y este efecto se mantiene hasta 120 horas después de haber concluido la fase conductual.

En el presente estudio la participación de PKM ζ en la interacción metaplástica del CAS sobre la LTP fue evaluada 120 horas después de la sesión de adquisición. Los datos anteriores sugieren que el cambio en la proporción de las subunidades del receptor NMDA podría representar el mecanismo responsable de una fase temprana de la metaplasticidad. No obstante, para la persistencia del efecto metaplástico, los datos anteriores posicionan a PKM ζ como un regulador clave en el mantenimiento de la fase tardía de dicho fenómeno.

PKM ζ y la memoria de largo plazo

Frecuentemente los cambios duraderos en la eficiencia sináptica se encuentran acompañados de modificaciones en la estructura neuronal (Lamprecht y LeDoux., 2004). Se ha observado que los cambios en la eficiencia sináptica se correlacionan bidireccionalmente con las modificaciones estructurales, por ejemplo, los incrementos en la eficiencia sináptica (LTP) provocan un aumento en el tamaño de las espinas dendríticas, mientras que los decrementos en la eficiencia sináptica (LTD) producen su disminución (Okamoto et al., 2004). Cambios en la morfología de las espinas dendríticas también se correlacionan con la formación de la memoria en diversas áreas cerebrales, como el hipocampo, la corteza visual y la corteza piriforme. Las modificaciones estructurales involucran la reorganización del citoesqueleto, que a su vez conlleva un aumento en la polimerización de actina, asimismo destacan los incrementos en el número de contactos

sinápticos, así como en el número y forma de las espinas dendríticas (Knafo et al., 2001; Lamprecht y LeDoux, 2004; Leuner et al., 2003; Ramirez-Amaya et al., 1999; Sin et al., 2002). En relación con lo anterior, se ha observado que los filamentos de actina formados tras la inducción de LTP incrementan la síntesis de PKM ζ , es decir, la polimerización de actina promueve la expresión de PKM ζ (Kelly et al., 2007). Estas investigaciones sugieren que PKM ζ se encuentra estrechamente relacionada con los cambios estructurales que subyacen al mantenimiento de fenómenos plásticos como la LTP y la memoria de largo plazo. Nuestro estudio muestra que PKM ζ es una proteína fundamental que forma parte de los mecanismos necesarios para el mantenimiento de la memoria de largo plazo del CAS, involucrando probablemente cambios morfológicos asociados a la permanencia de los trazos de memoria en la CI.

Los cambios, incluso semanas después del aprendizaje, no son modificaciones indelebles de la estructura sináptica, ya que permanecen dependientes de la actividad enzimática, y así, son capaces de experimentar alteraciones rápidas y dinámicas, permitiendo la incorporación de nuevas experiencias en los circuitos neuronales. A éste respecto, la estructura y función de PKM ζ provee al sistema de un mecanismo molecular capaz de preservar el almacenamiento de información a través de la síntesis de esta proteína cinasa que de manera persistente ejerce sus acciones sobre sus sustratos. Hrabetova y Sacktor en 1996 observaron que los cambios en la eficiencia sináptica se correlacionan bidireccionalmente con los niveles de expresión de la proteína PKM ζ . Es decir, durante la LTP se produce un aumento en la expresión de la cinasa, mientras que, durante la LTD hay un decremento en los niveles de expresión de esta proteína (Hrabetova y Sacktor, 1996). Los datos anteriores indican que los cambios en la expresión de PKM ζ obedecen a las demandas del sistema, brindando un mecanismo flexible que permitiría la incorporación de nueva información en trazos de memoria previamente formados.

Las evidencias experimentales mencionadas, incluyendo las del presente estudio, respaldan el papel que juega PKM ζ en el mantenimiento de distintos

fenómenos plásticos, incluso en distintas especies, como es el caso de *Drosophila melanogaster*, *Aplysia*, así como en roedores (Drier et al., 2002; Bouge et al., 2009; Pastalkova et al., 2006), lo que podría sugerir un mecanismo conservado evolutivamente para el almacenamiento de la información.

PKM ζ y metaplasticidad

Como se mencionó en líneas anteriores, la metaplasticidad es una forma de plasticidad homeostática que provoca cambios en la dirección o magnitud de la expresión subsecuente de plasticidad sináptica. Se ha observado la presencia de éste fenómeno en diversas áreas cerebrales involucradas con los procesos de aprendizaje y memoria, tales como el hipocampo y la neocorteza (Bear ,1996). La memoria de largo plazo coexiste con otras modificaciones sinápticas de larga duración, tales como la metaplasticidad. Dichas modificaciones operan sobre amplias escalas temporales y son cruciales para mantener la funcionalidad de las redes neuronales.

La segunda fase del presente estudio tuvo como objetivo examinar el papel que juega PKM ζ en la interacción metaplástica del CAS y la LTP en la vía Bla-CI. En este sentido, observamos que la microinfusión del inhibidor de PKM ζ (ZIP/10nM) en la CI 72 horas después de la adquisición del CAS, revierte el efecto metaplástico producido por el previo entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía Bla-CI. Como se observa en los grupos CAS+ZIP+LTP y PA+ZIP+LTP, al suprimir la memoria de largo plazo del CAS, se permite la subsecuente expresión de LTP en la CI, lo cuál contrasta con el grupo CAS+VEH+LTP, el cual fue microinfundido con el vehículo y no presentó LTP. Además, este cambio en la habilidad para inducir subsecuente plasticidad sináptica en la vía Bla-CI esta modulado por PKM ζ . Previos estudios de nuestro laboratorio han descrito que el efecto metaplástico que el CAS produce sobre la subsecuente LTP en la CI se mantienen por lo menos 120 horas después de concluida la fase conductual. A este respecto, nosotros examinamos el papel de PKM ζ en la interacción metaplástica del CAS y la LTP 120 horas después de la adquisición del CAS. Por lo tanto, nuestros resultados

muestran que PKM ζ juega un papel primordial en los mecanismos responsables de la persistencia de dicho efecto metaplástico.

Entre los estudios que implican a PKM ζ como parte de los mecanismos de la metaplasticidad, se encuentra el descrito por Ling y colaboradores en el 2002, en él se reporta que en registros de célula completa, la perfusión de PKM ζ potencia la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias mediadas por los receptores ionotrópicos a glutamato de tipo AMPA, lo cual impide la subsecuente expresión de la LTP inducida por estimulación de alta frecuencia (Ling et al., 2002). Aunado a esta evidencias, se ha descrito que el nivel de expresión de PKM ζ es regulado bidireccionalmente por la frecuencia de la actividad aferente, es decir, existe un decremento en la expresión de PKM ζ durante la LTD que se contrasta con su incremento prolongado durante la LTP (Hrabetova y Sacktor, 1996), así PKM ζ podría ser un correlato molecular del modelo BCM, el cual explica que la frecuencia de estimulación es directamente proporcional a la activación de la postsinapsis, esto es, que a frecuencias más altas hay mayor activación de la postsinapsis mientras que a frecuencias más bajas la activación es menor (Bear, 1996).

Podemos concluir que el estudio de los mecanismos que subyacen a la formación de la memoria de largo plazo es una valiosa herramienta para comprender cómo nuestras experiencias pasadas determinarán nuestras futuras respuestas. En este proyecto mostramos que PKM ζ es una proteína esencial para la persistencia de fenómenos plásticos en áreas neocorticales, y que su actividad es crucial para modular la interacción de dichos fenómenos en una red neuronal.

Por lo tanto, PKM ζ es una proteína que forma parte esencial de los mecanismos celulares necesarios para la formación de trazos perdurables de memoria, así como para la persistencia de fenómenos metaplásticos. Futuras investigaciones son necesarias para dilucidar los mecanismos, que aunados a la acción de PKM ζ , le permiten al sistema nervioso mantenerse en un estado

de equilibrio, indispensable para mantener la funcionalidad de los procesos mnémicos.

PKM ζ y el marcaje sináptico

Como se mencionó en líneas anteriores, la LTP es un fenómeno altamente específico, es decir que el cambio en la eficiencia sináptica se produce exclusivamente en las sinapsis que reciben la estimulación capaz de generar el fenómeno. Sin embargo, el cambio prolongado y específico en la eficiencia de la transmisión sináptica lleva a la siguiente pregunta: ¿cómo pueden llegar a las sinapsis apropiadas las proteínas que se han sintetizado en el cuerpo celular de una neurona que, normalmente, posee miles de contactos sinápticos? Una hipótesis aceptada para contestar esta pregunta es la hipótesis del marcaje sináptico (Synaptic tagging), propuesta por Frey y Morris en 1997. Esta hipótesis plantea que después de ser estimuladas, las sinapsis crean una marca capaz de capturar las proteínas relacionadas con la plasticidad (plasticity-related proteins, PRPs) de esta manera, nuevas proteínas sintetizadas actúan de manera específica en las sinapsis previamente activadas (Frey y Morris, 1997). Se ha considerado que la marca podría ser alguna molécula, o conjunto de ellas, presentes en las sinapsis activas. Los candidatos propuestos son varios e incluyen: proteínas cinasas tales como CaMKII y PKA; incrementos en las moléculas de adhesión celular en las sinapsis; alteraciones en el citoesqueleto, así como la síntesis local de proteínas (Martin y Kosik, 2002). Varios grupos de investigación han especulado que PKM ζ podría participar en el marcaje sináptico debido a que posee tres propiedades críticas: 1) la síntesis de PKM ζ es dependiente de la actividad (Osten et al., 1996); 2) la perfusión postsináptica de esta proteína es suficiente para incrementar la transmisión sináptica modulada por el receptor a glutamato de tipo AMPA (Ling et al., 2002) y 3) la inhibición de la cinasa revierte la fase tardía de la LTP (Serrano et al., 2005).

En concordancia con lo anterior, en el presente estudio observamos que PKM ζ modifica la forma en que las neuronas responden a subsecuentes estímulos, lo cual puede ser atribuido a la formación de la “marca sináptica” creada por

dicha proteína. Nuestros resultados sugieren que el marcaje sináptico formado por PKM ζ contribuye a la expresión de metaplasticidad en las sinapsis previamente activadas. De esta manera, la actividad persistente de PKM ζ contribuye al mantenimiento de las modificaciones activo-dependientes experimentadas por la sinapsis, proporcionando especificidad a la vía estimulada.

Papel de CaMKII en la persistencia de fenómenos plásticos

En los últimos años se ha logrado un gran avance en dilucidar los procesos involucrados en el mantenimiento de la memoria de largo plazo. Como observamos en el presente estudio, PKM ζ es una proteína fundamental para la persistencia de fenómenos plásticos, sin embargo, existe basta evidencia que implica a la calcio-calmodulina cinasa tipo II (CaMKII) en la permanencia tanto de la LTP como de la memoria. CaMKII es una enzima activada por Ca²⁺, constituye una familia de 28 isoformas derivadas de 4 genes (Soderling et al., 2001). La proteína CaMKII esta formada por un dominio catalítico que contiene un sitio de unión con el sustrato, y por un dominio regulador que contiene un sitio de autofosforilación (Treonina 286), esto le da la capacidad de estar activa aun en ausencia de Ca²⁺ (Rich y Schulman., 1998; Lisman, 1994., Lisman y Zhabotinsky., 2001). En concordancia con lo anterior, durante la LTP hay un incremento en la autofosforilación de CaMKII hasta por 8 horas después de la inducción (Fukunaga et al., 1993; Barria et al., 1997). También se ha reportado que al aumentar los niveles de CaMKII en la postsinapsis hay un incremento en la eficiencia sináptica (Lledo et al., 1995). En este mismo sentido, tras la inhibición de CaMKII se produce un bloqueo de la fase de mantenimiento de la LTP, así como una deficiencia en la adquisición, consolidación y mantenimiento de la memoria de largo plazo (Sanhueza et al., 2007; Frankland et al., 2001; Cao et al., 2008; Miller et al., 2002; Camarota et al., 2002; Wan et al., 2010).

Esta serie de investigaciones subrayan la importancia de CaMKII como un modulador de la formación y permanencia de la memoria, por lo que es probable que esta proteína forme asimismo parte de la señalización asociada a la expresión de metaplasticidad.

Implicaciones.

La participación de PKM ζ en el almacenamiento de la información en distintas regiones cerebrales puede tener implicaciones clínicas en diferentes patologías, en las cuales se considera que hay una retención anómala de la memoria, tales como el desorden de estrés postraumático (Serrano et al., 2008). En este sentido, el empleo de modelos animales, han mostrado que PKM ζ participa en la persistencia de la memoria asociada a un evento traumático, implicando la activación de diversas áreas cerebrales tales como el hipocampo y la corteza insular (Cohen et al., 2010). En consecuencia, estudiar el papel de PKM ζ en el mantenimiento de diversos fenómenos plásticos trae como resultado el planteamiento de nuevas estrategias farmacológicas para el tratamiento de distintos trastornos que podrían estar reflejando un incremento en la activación de diferentes redes neuronales.

Conclusiones

- Los resultados derivados del presente estudio muestran que la administración del inhibidor de la proteína PKM ζ , ZIP, en la CI suprime la memoria de largo plazo del CAS.
- Asimismo, corroboramos los datos obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio, donde el previo entrenamiento en el CAS modifica la posibilidad de inducir subsecuente LTP en la corteza insular en ratas adultas *in vivo*.
- Aunado a lo anterior, el presente estudio reveló que la inhibición de PKM ζ previene el efecto metaplástico producido por el entrenamiento en el CAS sobre la subsecuente inducción de LTP en la vía de comunicación que va del núcleo basolateral amigdalino a la corteza insular.

10. REFERENCIAS.

- Abbott, L.F. y Nelson, S.B. (2000). "Synaptic plasticity: taming the beast" *Nature neuroscience* 1178-1183.
- Abraham, W.C. y Bear, M.F. (1996). "Metaplasticity: The plasticity of synaptic plasticity", *TINS*, 19: 126-130.
- Abraham, W.C. y Hugett, A. (1997) "Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices", *Hippocampus*, 7: 137-145.
- Abraham, W.C., y Williams, J.M. (2008) "LTP maintenance and its protein synthesis-dependence". *Neurobiology of learning and memory* 89: 260-268.
- Artola, A., y Singer, W. (1990) "The involvement of N-methyl-D-aspartate receptors of induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex". *European Journal of Neuroscience* 2: 254-269.
- Ascher, P. y Nowak L. (1988) "The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture", *Journal of Physiology*, 399: 257-266.
- Atkinson, R. y Shiffrin, R. (1968) "Human Memory: a proposed system and its control processes". En KW Spence, JT Spence 1968 (Eds). *The Psychology of Learning and Motivation: Advances and Research and Theory* (vol 2) Academic Press, New York.
- Baddeley, A. "Psicología de la Memoria", *Editorial Debate*, (1983).
- Bailey, CH., Kandel, ER. (1993) "Structural changes accompanying memory storage". *Annu Rev Physiol*.55:397-42
- Bailey, C., Giustteton, M., Huang, Y., Hawkins, R.D. y Kandel, E. (2000) "Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory?". *Nature Review Neuroscience*, 1: 11-20.
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C., y Soderling, T.R. (1997) "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation", *Science*. 276: 2042-5.
- Bear, M.F. (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13453-13459.
- Bear, M.F., Connors, B. y Paradiso, M. (2001) "Neuroscience: Exploring the Brain". Williams and Wilkins Baltimore, EU.

- Bear, M.F. (2003). "Bidirectional synaptic plasticity: from theory to reality". *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 358, 649-655.
- Bear, M.F. y Kirkwood, A. (1993) "Neocortical Long-term potentiation". *Current Opinion in Neurobiology* 3: 197-202.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004) "Molecular mechanism of taste-recognition memory", *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 209-217.
- Bermúdez-Rattoni, F., y J.L., McGaugh, (1991) "Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition of inhibitory avoidance and conditioned aversion", *Brain Research*, 549, 165-170.
- Bermúdez-Rattoni, F. y Yamamoto, T. (1998) "Neuroanatomy of CTA: lesions studies". En Bures, J., Bermúdez-Rattoni, F. and Yamamoto, T. *Conditioned Taste Aversion*. Oxford Science Publication, USA. pp 27-40.
- Bienenstock, E.L., Cooper, L.N. y Munro, P.W. (1982). "Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex". *J Neurosci* 2, 32-48.
- Bliss, TVP y T Lomo (1973) "Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforante path", *Journal of Physiology*, 232:331-356.
- Bougie, J.K., Lim, T., Farah, C.A., Manjunath, V., Nagakura, I., Ferraro, G.B., y Sossin W.S. (2009) "The atypical protein kinase C in *Aplysia* can form a protein kinase M by cleavage", *J Neurochem.*, 4:1129-43
- Braun, J.J., P.S. Lasiter y S.W. Kiefer, S.W. (1982) "The gustatory neocortex of the rat", *Physiol. Psychol.*, 10: 13-45.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L.R., Viola, H., Kerr, D.S., Reichmann, B., Teixeira, V., Bulla, M., Izquierdo, I., y Medina JH. (2002) "Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation", *Cell Mol Neurobiol*, 3: 259-67
- Cao, X., Wang, H., Mei, B., An, S., Yin, L., Wang, L.P., y Tsien, J.Z. (2008) "Inducible and selective erasure of memories in the mouse brain via chemical-genetic manipulation", *Neuron*. 60: 353-66.
- Castillo, D., Figueroa-Guzmán, Y., y Escobar, M. (2006) "Brain-derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention", *Brain Research*, 1067: 250-255.

- Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G.A., Gubellini, P., Teuele, M.A., Berretta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolú, M., y Gulino, A.(2000) "Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory". *European Journal of Neuroscience*. 12: 1002-10012.
- Clapp, W.C., Kirk, I.J., Hamm, J.P., Shepherd, D. y Teyler, T.J. (2005). "Induction of LTP in the human auditory cortex by sensory stimulation". *The European journal of neuroscience* 22, 1135-1140.
- Clem, R.L., Celikel, T. y Barth, A.L. (2008). "Ongoing in vivo experience triggers synaptic metaplasticity in the neocortex". *Science (New York, NY)* 319, 101-104.
- Clugnet, M.C., Ledoux, J.E., y Morrison, S.F. (1990) "Unit responses evoked in amygdala and striatum by electrical stimulation of the medial geniculate body". *Journal of Neuroscience* 10:1055-1061
- Cohen, H., Kozlovsky, N., Matar, M.A., Kaplan, Z., y Zohar, J. (2010) "Mapping the brain pathways of traumatic memory: inactivation of protein kinase M zeta in different brain regions disrupts traumatic memory processes and attenuates traumatic stress responses in rats", *Eur Neuropsychopharmacol.* 4: 253-71
- Cooper, L.N. Liberman, F. y Oja, E. (1979) "A theory for the acquisition and loss of neuron specificity in visual cortex", *Biol Cybern*, 33: 9-28.
- Debbane, D., Gahwiler, B.H., y Thompson, S.M.(1996) "Coopetative interactions in the induction of long-term potentiation and depression of synaptic excitation between hippocampal CA3-CA1 cell pairs in vitro". *Proceedings of the national Academy of Science USA*. 93: 11225-11230.
- Derrick, B.E., Weinberger, S.B., Martinez, J.L Jr.(1991) "Opioid receptors are involved in a NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal Mossy Fiber-CA3 synapses". *Brain Research Bulletin*. 27:219-233.
- Drier, E.A., Tello, M.K., Cowan, M., Wu, P., Blace, N., Sacktor, T.C., y Yin, J.C.(2002) "Memory enhancement and formation for atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*". *Nat. Neurosci.* 5:316-324.
- Domjan, M. (1985) "Cue-consequence specificity and long delay learning revisited" *Annals of the New York Academy of Sciences* 443: 57-66.
- Eichenbaum, H. (1997) "To cortex: thanks for the memories". *Neuron* 19: 481-484.

- Erreger, K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ y Traynelis SF, (2005) "Subunit specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles". *Journal of Physiology (London)* 563: 345-358.
- Escobar, M., J. Fernández, R. Guevara-Aguilar y F. Bermúdez-Rattoni (1989) "Fetal brain grafts induce recovery of learning deficits and connectivity in rats with gustatory neocortex lesion". *Brain Research*, 478: 368-374.
- Escobar, M., Barea-Rodríguez, E., Derrick, B., Reyes, J., y Martínez, J. (1997) "Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation", *Brain Research*, 751: 330-335.
- Escobar, M., Chao, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (1998a) "In vivo long-term potentiation in insular cortex: NMDA receptor dependence", *Brain Research*, 779: 314-319.
- Escobar, M., Alcocer, I. y Chao V. (1998b) "The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo", *Brain Research*, 812: 246-251.
- Escobar, M., y Bermúdez-Rattoni, F. (2000) "Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention", *Brain Research*, 852: 208-212.
- Escobar, M., Figueroa-Guzmán Y. y Gómez-Palacio-Schjetnan A. (2003) "In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor", *Brain Research*, 991: 274-279.
- Escobar, M.L. y Derrick, B.(2007) "Long-term potentiation and depresión as puntative mechanisms for memory formation". In *Neural plasticity and memory: Federico Bermúdez Rattoni*. Ed. CRC Press, pp: 15-46.
- Frankland, P.W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A., y Silva, A.J.(2001) "Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory", *Nature*. 411: 309-13
- Frey U, Morris RGM.(1997) "Synaptic tagging and long-term potentiation" *Nature* 1997; 385: 533-6.
- Fukunaga, K., Muller, D., y Miyamoto, E. (1996) "CaM kinase II in long-term potentiation", *Neurochem Int.* 4: 343-58
- García, J., Kimeldorf, D. y Koelling, R. (1955) "Conditioned aversion to sacharine resulting from exposure to gamma radiation", *Science*, 122: 157-158.

- García, J., Koelling, R. (1966) "Relation of cue to consequence in avoiding learning" *Psychonomic Science* 4: 123-124.
- García, J. y Koelling, R. (1967) "A comparison of aversions induced by x-rays, toxins, and drugs in the rat", *Radiat Res Suppl*, 7:439-50
- Garcia, J., Lasiter, P.S., Bermudez, R., Deems, D.A. (1895) "A general theory of aversión learning" *Annals of New York Academy Sciences* 443: 8-21.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrog, R., Rivier, J. y Vale, W. (1993) "Coupling hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A", *Molecular Cell Biology*, 13: 4852-4859.
- Hardingham, G.E. y Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends in neurosciences* 26, 81-89.
- Hebb, D. (1949). "The organization of behavior". *Theor. Biol.* 2: 204-35.
- Hernandez, A.I., Blace, N., Crary, J.F., Serrano, P.A., Leitges, M., Libien, J.M., Weinsten, G., Tcherapanov, A., Sacktor, T.C. (2003) "Protein kinase M ζ synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C ζ catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory", *J. Bio. Chem*, 278: 40305-40316.
- Hirsch, J.C., Crepel, F. (1990) "Use-dependent changes in synaptic efficacy in the rat prefrontal neurons in vitro" *Journal of Physiology* 427: 32-49.
- Hrabetova, S., Sacktor, T.C (1996) "Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenace of long-term potentiation and long-term depression". *J. Neurosci*, 16: 5324-5333.
- Hrabetova, S., Sacktor, T.C (2001) "transient traslocation of conventional protein kinase C isoforms and persistent downregulation of atypical protein kinase M zeta in long-term depression". *Brain Res.* 95: 146-152.
- Huang, Y.Y., Colino, A., Selig, D.K. y Malenka, R.C. (1992). The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science New York*, 255, 730-733.
- Jahr, C. y Stevens, C. (1987) "Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons", *Nature*, 325: 522-525.

- Jones, M., French, P., Bliss, T. y Rosenblum, K. (1999) “Molecular mechanism of long-term potentiation in the insular cortex in vivo”, *Journal of Neuroscience*. 19: 1-8.
- Kandel, E. (2001) “The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses”, *Science*, 294: 1030-1038.
- Kanter, E.D., y Haberly, L.B.(1993) “Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABAA blockade”. *Journal of Neuroscience* 13: 2477-2482.
- Kennedy, M.B. y Marder, E.M. (1992) “Cellular and molecular mechanism pf neuronal plasticity”. *Introduction to molecular neurobiology*. Ed. by Hall ZW. Massachusetts: Sinauer Associates INC, pp. 463-495.
- Kelly, M., Crary, J.F., y Sacktor, C. (2007) “Regulation of protein kinase M Zeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation”. *J.Neurosci*. 27: 3439-3444.
- Kelly, M., Yao, Y., Sondhi, R. y Sacktor, C. (2007) “Actin polymerization regulates the synthesis of PKM ζ in the LTP”, *Neuropharmacology*, 52: 41-45.
- Kirkwood, A., Lee, H., y Bear, M.F. (1995) “Co-regulation of long- term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity in visual cortex by age and experience”. *Nature* 375:328-331.
- Krettek, J. y Price J. (1974) “A direct input from the amygdala to the thalamus and the cerebral cortex”. *Brain Research*, 67: 169-174.
- Knafo, S., Grossman, Y., Barkai, E. y Benshalom, G. (2001). Olfactory learning is associated with increased spine density along apical dendrites of pyramidal neurons in the rat piriform cortex. *The European journal of neuroscience* 13, 633-638
- Komatsu, Y., Fuji, K., Maedan, J., Sakaguchi, H., y Tomaya, K. (1988) “Long-term potentiation of synaptic transmisión in kitten visual cortex”. *Journal of Neurophysiology*. 59: 24-141.
- Lamprecht, R., y LeDoux, J. (2004). “Structural plasticity and memory”. *Nat Rev Neurosci*, 5(1), 45-54.
- LeDoux, J. (1993) “Emotional memory system in the brain”, *Behavioral Brain Research*, 58: 69-79.
- Lee, S.M., Wisskopf, M.G., Ebner, F.F., (1991) “Horizontal long-term potentiation of responses in rat somatosensory cortex”. *Brain Research* 544: 303-310.

- Leuner, B., Falduto, J. y Shors, T.J. (2003). Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23, 659-665.
- Ling, D.S., Benardo, L.S., y Sacktor, T.C.(2006) “ Protein kinase M ζ enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors”. *Hipocampus* 16: 443-452
- Ling, D.S., Benardo, L.S., Serrano, P. A., Blace, N., Kelly, M.T.,Crary, J.F., y Sacktor, T.C.(2002) “Protein kinase M ζ is necessary and sufficient for LTP maintenance”. *Nat. Neurosci.*,5: 295-296
- Liu, F. X., Tari, P.K., y Haas, K. (2009) PKM Zeta restricts dendritic arbor Growth by filopodial and branch stabilization within the intact and awake developing brain”. *J. Neurosci.* 29: 12229-12235.
- Lisman, J.(1994) “ The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory”. *Trends. Neurosci.* 17:406-412.
- Lisman, J.E., y Zhabotinsky, A.M. (2001) “A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly”, *Neuron*, 2: 191-201.
- Lledo, PM., Hjelmstad, G.O., Mukherji, S., Soderling, T.R., Malenka, R.C., y Nicoll, R.A. (1995) “Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24: 11175-9.
- Losi, G., Prybyłowski, K., Fu, Z., Lou, J.H., y Vicini, S. (2002) “Silent synapses in developing cerebellar granule neurons”. *Journal of Neurophysiology.* 87: 1263-1270.
- Lynch, M.A.(2004) “Long-term potentiation and memory” *Physiological Reviews* 84: 87-136.
- Malenka, R. (1991) “Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus”, *Neuron*, 6: 53-60.
- Malenka, R. y Nicoll, R. (1993) “NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms”, *TINS*, 16: 521-527.
- Martin, K.C., Kosik. K.S. (2002) “Synaptic tagging -- who's it?”, *Nat Rev Neurosci.* 10: 813-20.
- Martínez, J. y Derrick B. (1996). “Long term potentiation and learning”, *Annual Review of Psychology*, 47: 173-203.

- McGaugh, J., Introini-Collison, I., Nagahara, A., Cahill, L., Brioni, J. y Castellano, C. (1990). "Involvement of the amygdaloid complex in neuromodulatory influences on memory storage", *Neuroscience Behavioral Review*, 14: 425-431.
- McKernan, M.G. y Shinnick-Gallagher, P. (1997). "Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro", *Nature*, 390: 607-611.
- McGowan, B., Hankins, W.G., y García, J. (1972) "Limbic lesions and control of the internal and external environment", *Behavior and Biology*, 7: 841-852.
- Milner, B., Squire, LR., y Kandel ER. (1998) "Cognitive Neuroscience and the study of memory". *Neuron*, 20: 445-468.
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J.K., Jones, Y., Martone, M.E., y Mayford, M. (2002) "Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation", *Neuron*, 3: 507-19.
- Miranda, M.I., Ramírez-Lugo, L., Bermúdez-Rattoni, F. (2000) "Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus" *Brain Research* 882: 230-235.
- Mizuno, M., Yamada, K., He, J., Nakajima, A., Nabeshima, T.(2003) "Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation" *Learn. Mem.*, 10: 108-115.
- Moguel-Gonzales, M.G., Gomez-Palacio Schejetnan, A., Escobar, M.L.(2008) "BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis". *Neurobiology of Learning and Memory*. 90: 584-587.
- Muellbacher, W., Ziemann, U., Boroojerdi, B., Cohen, L.G. y Hallet, M. (2001) "Role of the human motor cortex in rapid motor learning", *Exp Brain Research* 136: 431-438.
- Muslimov, I.A., Nimmrich, V., Hernandez, I.A., Tcherepanov, A., Sacktor, T.C., y Tiedge, H. (2004) "Dendritic transport and localization of protein kinase M Zeta mRNA: implications for molecular memory consolidation". *J. Biol. Chem*, 279: 52613-52622.
- Newton, A.C. (2001) "Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions". *Chem. Rev.* 101: 2353-2364.

- Newton, A.C. (2003) "Regulation of ABC kinases by phosphorylation, cofactors and macromolecular interactions". *Chem. Rev*, 101:2353-2364.
- Nicoll, R. y Malenka, R. (1995) "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus", *Nature*, 377 (6545): 115-118.
- Nishizuka, Y. (1988) "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular recognition". *Nature*, 334: 661-665.
- Nishizuka, Y. (1995) "Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses". *FASEB J*, 9: 484-496.
- Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. y Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature neuroscience* 7, 1104-1112.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., y Nishizuka, Y. (1988) "The structure, expression and properties of additional members of protein kinase C family". *J. Biol. Chem.* 263: 6927-6932
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., y Nishizuka, Y. (1989) "Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: the structure, expression and properties". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 3099-3103.
- Osten, P., Valsamis, L., Harris, A., y Sacktor TC.(1996) "Protein synthesis-dependent formation of protein kinase Mzeta in long-term potentiation", *J Neurosci*, 8:2444-51.
- Pang, P., Teng, H., Zaitzev, E., Woo, N., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K., Yung, W., Hempstead, B. y Lu, B. (2004) "Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity", *Science*, 306: 487-491.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A., y Sacktor, C. (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP", *Science*, 313: 1141-1144.
- Paxinos, G. y Watson, C. (1995) *The Rat Brain in the stereotaxic coordinates*. Academic Press, Orlando FL.
- Pérez-Otaño I y Ehlers MD, (2005). "Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking" *Trends in Neuroscience* 28(5): 229-238.

- Philpot BD, Sekhar AK, Shouval HZ y Bear MF, (2001) “Visual experience and deprivation bidirectionally modify the composition and function of NMDA receptors in visual cortex”. *Neuron* 29:157-169.
- Philpot, B.D., Cho, K.K. y Bear, M.F. (2007). Obligatory role of NR2A for metaplasticity in visual cortex. *Neuron* 53, 495-502.
- Quinlan, E.M., Lebel, D., Brosh, I. y Barkai, E. (2004) “A molecular mechanism for stabilization of learning-induced synaptic modifications”, *Neuron*, 41: 185-192.
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M.L., Chao, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 9, 631-636.
- Rich, R.C., y Schulman, H. (1998) “Substrate-directed function of calmodulin in autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II”, *J Biol Chem.* 43: 28424-9.
- Rioult-Pedotti, M.S. Friedman, D., Hess, G. y Donoghue, J.P. (1998). “Strengthening of horizontal cortical connection following skill learning”, *Nature Neuroscience*, 1: 230-234.
- Rioult-Pedotti, M., Friedman, D. y Donoghue. J. (2000) “Learning-Induced LTP in Neocortex”, *Science*, 290: 533-536.
- Rosenblum, K., Meiri, M., Dudai, Y. (1993) “Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex” *Behavioral and Neural Biology* 59: 49-56.
- Rosenblum, K., Berman, D.E., Hazvi, s., Lamprecht, R., Duday, Y. (1997) “NMDA receptor and the tyrosin phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex” *Journal of Neuroscience* 17: 5129-5135.
- Rogan, MT., Staubli, U.V. y LeDoux, J.E., (1997). “Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala”, *Nature*, 390: 604-607.
- Sacktor, T.C., Osten, P., Valsamis, H., Jiang, X., Naik, M.U., Sublette, E. (1993) “Persistent activation of the ζ isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation”. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 90:8342-8346.
- Sanhueza, M., McIntyre, C.C., y Lisman, J.E. (2007) “Reversal of synaptic memory by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor”, *J Neurosci.* 19: 5190-9

- Schroeder, B.W. y Shinnick-Gallagher, P. (2005). Fear learning induces persistent facilitation of amygdala synaptic transmission. *The European journal of neuroscience* 22, 1775-1783.
- Schwartz, J.H., (1993) "cognitive kinases". *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 90:8310-8313.
- Schwartz, J.H., Greenberg, S. M.(1987) "Molecular mechanism for memory: second-messenger induced modifications of protein kinases in nerve cells". *Annu. Rev. Neurosci.* 10:459-476.
- Serrano, P.A., Friedman, E.L., Kenney, J., Taubenfeld, M.S., Zimmerman, J.M., Alberini, C., Kelley, A.E., Maren, S., Yin, J.C.P., Sacktor T.C., Fenton, A.A.(2008) "PKM ζ maintains spatial, instrumental, and classically-conditioned long-term memories" *Plos. Biol.* 6: 2698-2705.
- Serrano, P.A., Yao, Y., Sacktor T.C.(2005) "persistent phosphorylation by protein kinase M ζ maintains late-phase long-term potentiation". *J. Neurosci.* 25:1979-1984.
- Shema R., Sacktor T.C., y Dudai, Y. (2007) "Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta". *Science*, 17: 951-953.
- Shema R., Hazvi, S., y Sacktor T.C. (2009) "Boundary conditions for the maintenance of memory by PKM zeta in neocortex". *Learning and Memory*, 16: 122-128.
- Simon, S., Araujo, I., Gutierrez, R. y Nicoleis, M. (2006) "The neural mechanism of gustation: a distributed processing code", *Nature*, 7: 890-901.
- Sin, W.C., Haas, K., Ruthazer, E.S. y Cline, H.T. (2002). Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature* 419, 475-480.
- Soderling, TR., y Stull, J.T. (2001) "Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases", *Chem Rev.* 8: 2341-52
- Stefan, K., Kunesch, E., Cohen, L.G., Benecke, R. y Classen, J. (2000). "Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation". *Brain* 123 Pt 3, 572-584.
- Steward, O., Schuman, EM. (2003) "Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons" *Neuron.*;40(2):347-59.
- Sweatt, J.D. (1999) "Toward a molecular explanation for long-term potentiation". *Learn. Mem.* 6:399-416.

- Thompson, S.M., Mattison H.A., Nestor, M.W. (2005) “ Morphological correlates of long-term potentiation and depression” *Cellscience* Vol.2
- Travers, S.P. (1993) “Orosensory processing in neural systems of the nucleus of the solitary tract” en S.A. Simon y S.T. Roper (Eds.) *Mechanisms of Taste Transduction*. CRC Press: USA. pp. 339-394.
- Tsumoto, T. (1992) “Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex”, *Prog. Neurobiol.* 39: 209-228.
- Tulving E (1972) *Episode and semantic memory*. E. Tulving y W Donaldson (Eds) *Organization and memory* pp 382-402. New York Academic Press.
- Tulving E. y Pearlstone Z (1966) “Availability versus accessibility of information in memory for words”, *J verb learn verb behavior*, 5: 581-591.
- Turrigiano, G.G., Leslie, K.R., Desai, N.S., Rutherford, L.C. & Nelson, S.B. (1998). Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391, 892-896.
- Turrigiano, G.G. y Nelson, S.B. (2000). Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current opinion in neurobiology* 10, 358-364.
- Turrigiano, G.G. y Nelson, S.B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature reviews* 5, 97-107.
- Wan, H., Mackay, B., Iqbal, H., Naskar, S., y Kemenes, G. (2010) “Delayed intrinsic activation of an NMDA-independent CaM-kinase II in a critical time window is necessary for late consolidation of an associative memory”, *J Neurosci.*, 1: 56-63.
- Wang, J.H. y Stelzer, A. (1996). “Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic desinhibition in CA1 pyramidal cell dendrite”, *Journal of Neurophysiology*, 75: 1687-1702.
- Whitlock, J., Heynen, A., Shuler, M. y Bear, M. (2006) “Learning induces long-term potentiation in the hippocampus”, *Science*, 313: 1093-1097.
- Wolters, A., Sandbrink, F., Schlottmann, A., Kunesch, E., Stefan, K., Cohen, L.G., Benecke, R. y Classen, J. (2003). “A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex”. *Journal of neurophysiology* 89, 2339-2345.

- Yao, Y., Kelly, M.T., Sajikumar, S., Serrano, P., Tian, D., Bergold, P.J., Frey, J.U., y Sacktor, T.C (2008) “PKM Zeta manteins late-LTP by enhancing NSF/GluR2-mediated trafficking of postsynaptic AMPA receptors” *J. Neurosci.* 28: 7820-7827.
- Yashiro, K., y Philpot, B. D. (2008). “Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity”. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081-1094.
- Yashosima, Y., Yamamoto, T. (1997) “Rat gustatory memory requires protein kinase C in the amygdala and cortical gustatory area” *Neuroreport* 8: 1363-1367.
- Yuste, R., Bonhoeffer, T.(2001) “Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity”. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 1071-1089.