



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE
PROTEÍNAS EN LA CORTEZA INSULAR SOBRE LA
CONSOLIDACIÓN DE UN APRENDIZAJE
INCREMENTADO EN LA TAREA DE EVITACIÓN
INHIBITORIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

(Neurobiología)

P R E S E N T A :

SINUHÉ MUÑOZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO AGUSTÍN PRADO ALCALÁ.



Campus Juriquilla, Querétaro. Marzo 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del Comité Tutor certificamos que la tesis elaborada por: Sinuhé Muñoz Sánchez, cuyo título es: “Efectos de la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular sobre la consolidación de un aprendizaje incrementado en la tarea de evitación inhibitoria” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente

Dra. Isabel Miranda Saucedo

Secretario (Tutor)

Dr. Roberto Agustín Prado-Alcalá

Vocal

Dra. Brenda Anguiano Serrano

Suplente

Dra. Martha L. Escobar Rodríguez

Suplente

Dra. Anaid Antaramian Salas

Aprobado por el Comité Académico

Coordinadora del Programa
Dra. María Teresa Morales Guzmán.

RESUMEN

La teoría más aceptada sobre la consolidación de la memoria sugiere que este proceso está mediado por la síntesis de proteínas. A pesar de amplias pruebas que parecen apoyar esta hipótesis, ha sido rebatida por datos recientes. Se observó que la administración del inhibidor de la síntesis de proteínas anisomicina, produce efectos secundarios (liberación masiva de dopamina, noradrenalina y serotonina, en la amígdala, además de acetilcolina en el hipocampo), los cuales pueden ser la causa de los efectos amnésicos. Por otro lado, se ha demostrado que el incremento de la experiencia de aprendizaje impide los efectos amnésicos de la administración sistémica de la cicloheximida. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar si se presenta el efecto protector del aprendizaje incrementando en ratas tratadas con 31.25 µg/0.5 µL de anisomicina o vehículo en la corteza insular inmediatamente después o 30 min antes del entrenamiento de la tarea evitación inhibitoria, durante el que se aplicó un choque de 1.0, 3.0 ó 5.0 mA. Se midió la memoria 48 horas después del entrenamiento. La administración post-entrenamiento de anisomicina produjo amnesia en aquellos grupos que fueron entrenados con 1.0 ó 3.0 mA, mientras que el grupo entrenado con 5.0 mA no presentó amnesia. Administrada pre-entrenamiento, la anisomicina interfirió con la MLP en todos los grupos. Estos resultados permiten sugerir que el aprendizaje incrementado ejerce un efecto protector contra la amnesia producida por la anisomicina cuando la se administra post-entrenamiento y que el mismo aprendizaje incrementado acelera el proceso de consolidación.

ABSTRACT

The most accepted theory about memory consolidation suggests that this process is mediated by protein synthesis. Despite ample evidence that seems to support this hypothesis, it has been challenged by some recent evidence. It was observed that central administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI) has important side effects (huge release of dopamine, noradrenalin and serotonin, in the amygdala and hippocampus and also acetylcholine in the latter structure), which may be the cause of the reported amnesic effects. On the other hand, it has reported that enhanced inhibitory avoidance learning (IA) protects against the amnesic effects of systemic cycloheximide. The objective of the present work was to determine whether enhanced IA also has a protective effect in rats treated with ANI in the insular cortex. Independent groups of rats were trained in IA using different intensities of foot-shock (1.0, 3.0, or 5.0 mA). ANI (31.25 μ g/0.5 μ L) or its vehicle was administered 30 min before or immediately after training. Forty-eight hours later, their retention latencies they measured. Pre-training ANI produced amnesia in all groups, while post-training ANI produced amnesia only in the 1.0 and 3.0 mA groups. These data suggest that the protective effect of enhanced IA training (high foot-shock group) was due to acceleration of the memory consolidation process.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por generar los recursos que contribuyen al conocimiento e impulsan el desarrollo de este gran país. A todos sus profesores que contribuyeron de distintas maneras en mi formación académica y profesional.

Al Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, perteneciente al Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva del Instituto de Neurobiología Campus Juriquilla Querétaro, Universidad Nacional Autónoma de México, en el cual fue realizado este trabajo con el apoyo económico de CONACyT 128259 (Becario No. 267278).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Proyecto IN208110.

A mi tutor el Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá, por su invaluable orientación y apoyo moral en el desarrollo de la presente tesis y en mi formación académica.

A la Dra. Gina Lorena Quirarte por sus observaciones en la parte conductual del trabajo de tesis.

A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por su valiosa colaboración en la realización de cada uno de los experimentos. Así como su amistad y apoyo moral.

A la Dra. Martha L: Escobar Rodríguez y la Dra. Teresa Morales por su asesoría, comentarios y revisiones al formar parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Sofía Díaz Miranda por su revisión detallada del formato y redacción de la tesis, así como sugerencias para hacer más didáctico este trabajo para el lector.

A los integrantes de mi jurado de examen por sus valiosas contribuciones al presente escrito, la Dra. Isabel Miranda Saucedo, Dra. Brenda Anguiano Serrano, Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez y Dra. Anaid Antaramian Salas.

Al Sr. Ángel Méndez Olalde por su valioso apoyo en el cuidado de los animales y limpieza del material. Así como también por brindarme su valiosa amistad. Muchas gracias por todo.

A la M.V.Z. Norma Serafín López por su valiosa y oportuna ayuda técnica en la obtención del material de laboratorio. Muchas gracias.

Al M.V.Z. José Martín García por proporcionar los animales requeridos para el desarrollo de los experimentos.

A la Psicóloga María de Lourdes Lara Ayala por el apoyo técnico proporcionado en el servicio de videoconferencia en múltiples exámenes y evaluaciones durante el transcurso de la maestría.

A la M.C. Leonor Casanova Rico y a todo el personal de la unidad de servicios académicos por su oportuno apoyo en todos los trámites realizados.

A todos los compañeros del laboratorio B-04 por el tiempo compartido y su grata convivencia: Miguel, Cris Siller, Robbi, Raúl, Anaí, Evelina, Yectivani, Inés, Maribel, Alessander, Karlita, Lucía, Viri y Araceli.

Agradezco en especial a Sofía por tu valiosa amistad y confianza dentro y fuera del trabajo del laboratorio. Muchas gracias amiga.

A la memoria de Jorge, un compañero y amigo con quien aprendí muchos aspectos de la academia y de la vida misma.

Agradezco a mis compañeros de la maestría por su grata compañía Claudia, Olivia, Daniel, Haydée y Paty.

DEDICATORIAS

A mi querida Alicia:

*Por todos los momentos buenos y difíciles que hemos pasado juntos. Te agradezco tu valioso apoyo y cariño.
Te amo.*

A mis padres Alfredo y Noemí:

Por su indispensable apoyo para la realización de este posgrado, sin lo cual no hubiera sido posible.

La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada.

Karl Popper (1902-1994)

ÍNDICE

Resumen	iii
Abstract	iv
Agradecimientos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aprendizaje y Memoria	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Memorias de corto y largo plazo	3
2.2 Hipótesis acerca de la consolidación	5
2.3 Consolidación: Las síntesis de proteínas	5
2.4 ¿Es necesaria la síntesis de proteínas para la consolidación?	10
2.5 Efecto protector del aprendizaje incrementado en la tarea de evitación inhibitoria	11
2.6 La corteza insular: Organización estructural	15
2.7 Corteza insular y memoria de largo plazo	19
3. PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
3.1 Hipótesis	22
3.2 Objetivo General	23
3.3 Objetivos Específicos	23
4. MÉTODO	23
4.1 Sujetos	23
4.2 Cirugía Esterotáxica	24
4.3 Aparatos	24
4.4 Procedimiento conductual	25
4.5 Fármacos	26
4.6 Administraciones	26
4.7 Efecto de tratamientos post-entrenamiento sobre la memoria de largo plazo	27

4.8	Efecto de tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo	27
4.9	Efecto de tratamientos administrados. 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de corto plazo	29
4.10	Dependencia de estado	30
4.11	Verificación de la colocación de cánulas	31
4.12	Análisis estadístico	33
5.	RESULTADOS	33
5.1	Efecto de tratamientos administrados inmediatamente después del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo	33
5.2	Efecto de tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo	36
5.3	Efecto de tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de corto plazo	38
5.4	Dependencia de estado	41
6.	DISCUSIÓN	42
6.1	La anisomicina administrada posterior al entrenamiento no daña la memoria de largo plazo en condiciones de aprendizaje incrementado	42
6.2	La anisomicina administrada antes del entrenamiento produce deterioro en la memoria de largo plazo en condiciones de aprendizaje incrementado	45
6.3	Consideraciones acerca de la síntesis de proteínas en la formación de memoria de largo plazo	53
7.	CONCLUSIONES	58
8.	REFERENCIAS	59
9.	ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	68

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aprendizaje y Memoria

Cada una de las cosas que se perciben en el entorno son estímulos que pueden llegar a proporcionar información, la cual, una vez captada por nuestras células receptoras y dependiendo del tipo de información (*e.g.* dolor, mecánica, gustativa), es llevada y analizada a diferentes regiones del cerebro. Cuando estos estímulos son repetitivos y presentan contigüidad o tienen una carga emocional, entonces la información proporcionada adquiere un carácter muy importante, debido a que nos indica regularidades en el ambiente que nos permitirán generar estrategias más eficientes de adaptación. La memoria representa una de las cualidades más notables de las que se valen los organismos para poder adaptarse a su medio ambiente.

Aunque existen múltiples conceptos sobre el aprendizaje, la mayoría de ellos coincide en que este proceso es un cambio en la conducta, relativamente permanente, que es resultado de la experiencia (Hilgard y Bower, 1973; Thompson, 1986); la información derivada de las experiencias de aprendizaje, es almacenada y recuperada a lo largo del tiempo, es decir, la memoria (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998). En la actualidad los investigadores del campo de la neurobiología de la memoria se han interesado en la búsqueda de los trazos de memoria, también llamado engrama. El trazo de memoria es el conjunto de cambios en el sistema nervioso que representan a la información almacenada (Tronson y Taylor, 2007). Esta búsqueda ha originado dos grandes líneas de investigación, una la constituye la búsqueda de los mecanismos celulares y moleculares de los que depende el almacenamiento de información, y la segunda la búsqueda de las estructuras cerebrales involucradas en dicho almacenamiento. Entre los mecanismos que subyacen al establecimiento de la memoria se encuentran: a) cambios en la cantidad de mediadores químicos en la sinapsis que participan en el proceso, y b) incremento en la síntesis de proteínas neuronales (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998).

La función de memoria es una función unitaria compuesta de numerosos sistemas y subsistemas. Estos diferentes sistemas poseen características comunes que justifican su denominación común como memoria. Todas las formas de memoria implican tres fases, que son: 1) adquisición, ocurre cuando la nueva información llega para ser procesada y mantenida por un corto periodo; 2) consolidación, en esta fase la información, a través de la síntesis de proteínas, pasa de un estado lábil a uno estable y finalmente 3) la evocación, que sucede cuando

se recupera la información almacenada para poder ser utilizada si es necesario (Baddeley, 1999).

La memoria también puede ser clasificada en función de la temporalidad, en este caso se habla de la memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP). Esta clasificación se revisará con más detalle más adelante.

En la búsqueda de las estructuras cerebrales que están participando en estos procesos, en la presente investigación se decidió utilizar el modelo de la evitación inhibitoria, haciendo uso de la rata como sujeto experimental. Este modelo ofrece la ventaja de que el entrenamiento se puede llevar a cabo en una sola sesión de corta duración, se reduce considerablemente la posibilidad de que los resultados experimentales se vean alterados por la intervención de factores ambientales como variaciones térmicas, humedad, entre otros, que en el caso de entrenamientos de larga duración pueden afectar la ejecución de los animales.

La corteza insular fue elegida para este estudio por ser una región que puede ser clave en diversos procesos de aprendizaje y memoria en cuanto a que en ella converge información de todas las vías somatosensoriales y se conecta con el sistema límbico y con otras partes de la corteza cerebral. Se ha descubierto que la corteza insular participa de manera importante en la formación de ciertas memorias de tipo aversivo o emocionales. Estudios recientes indican que la corteza insular es una región que podría formar parte del sistema de memoria del lóbulo temporal, así como tener una participación en la fase inicial de consolidación de la memoria (Bermúdez *et al.*, 2005; Balderas *et al.*, 2008). Además de que ya se ha comprobado su participación en la tarea de evitación inhibitoria (EI).

Se ha establecido que uno de los eventos moleculares que parece participar en la formación de la memoria de largo plazo es la síntesis de proteínas. Si la síntesis de proteínas es indispensable para el almacenamiento de la memoria de largo plazo, entonces la inhibición de dicha síntesis deberá producir amnesia una vez que la información es adquirida en periodos largos. En nuestro laboratorio se ha encontrado que bajo condiciones de entrenamiento incrementado, la administración sistémica de inhibidores de síntesis de proteínas que usualmente son amnésicos dejan de serlo. En este trabajo se propone determinar si en la corteza insular esto también ocurre.

2. ANTECEDENTES

2.1 Memorias de corto y largo plazo

La información adquirida o aprendida existe primero en una forma lábil, susceptible a la interrupción, es la MCP; después se estabiliza y perdura en el tiempo en forma de MLP. La MLP se estabiliza mediante un proceso hipotético conocido como consolidación.

El estudio formal y sistemático de la temporalidad de la memoria inició con los estudios realizados por el alemán Hermann Ebbinghaus durante el siglo XIX. Este investigador completó una serie de experimentos utilizando materiales verbales conocidos como las sílabas sin sentido consonante-vocal-consonante, usándose así mismo como sujeto experimental. Tras la verificación de su trabajo en 1885 publicó un informe de su “Uber das Gedachtnis” (Acerca de la memoria). El libro contiene entre otros resultados los del olvido en función del tiempo, también conocidos como la curva del olvido. Años más tarde, en 1890, el profesor en psicología de la Universidad de Harvard, William James propuso en su obra “Principios de Psicología”, la primera clasificación de memoria con base a su duración. Estableció la distinción entre dos tipos de memorias: Memorias primarias y memorias secundarias, las cuales corresponden, en forma respectiva, a la MCP y la MLP (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998).

En 1971 Atkinson y Shiffrin plantearon un modelo similar según el cual la información aprendida o adquirida pasa a través de una serie de almacenes sensoriales, uno para cada modalidad sensorial. Si esta información es relevante para el organismo, se transmite después a un almacén de corto plazo o MCP; de otra forma decae y es rápidamente eliminada. Dicha MCP es de poca capacidad y su función es mantener la información consciente y mediar el paso de esta información a un almacén de capacidad ilimitada o MLP, donde se guardan los recuerdos aún para toda la vida (Atkinson y Shiffrin, 1971; Baddeley, 1999). El modelo de Atkinson y Shiffrin propone que la información se transfiere de la MCP a la MLP comúnmente a través de la repetición de la información recién adquirida. Este modelo es estrictamente lineal ya que supone que el primer almacén es necesario para que la información pase al segundo (Squire y Kandel, 1999).

Sin embargo, algunos reportes sugieren que la MCP no necesariamente es siempre el primer paso hacia la MLP. La estimulación o bloqueo farmacológicos de varios sistemas de neurotransmisión (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato y GABA) en la corteza entorrinal y en el área de CA1 del hipocampo pueden afectar la MCP sin alterar la MLP en una

tarea de evitación inhibitoria (EI); este aprendizaje es motivado por el miedo que el animal asocia a un determinado contexto con un estímulo que genera aversión. Ante la reexposición al contexto el animal despliega conductas de evitación, las cuales son medidas e interpretadas como fuerza del condicionamiento (Igaz *et al.*, 2002; Izquierdo *et al.*, 1999). Estos estudios sugieren que la MCP puede no ser una etapa necesaria para la formación de la MLP y que ésta última se procesa independiente y paralelamente a la MCP.

Por lo tanto, en la actualidad se reconoce que la memoria tiene dos etapas: la MCP y la MLP. La MCP es de corta duración (segundos u horas), y la MLP tiene una duración mayor, de días, meses o hasta años (Dudai, 2004). La información adquirida existe primero en una forma lábil, susceptible a la interrupción, después se estabiliza y perdura en el tiempo en forma de MLP. La MLP se estabiliza mediante un proceso conocido como consolidación y es un requisito indispensable para su formación (Figura 1).

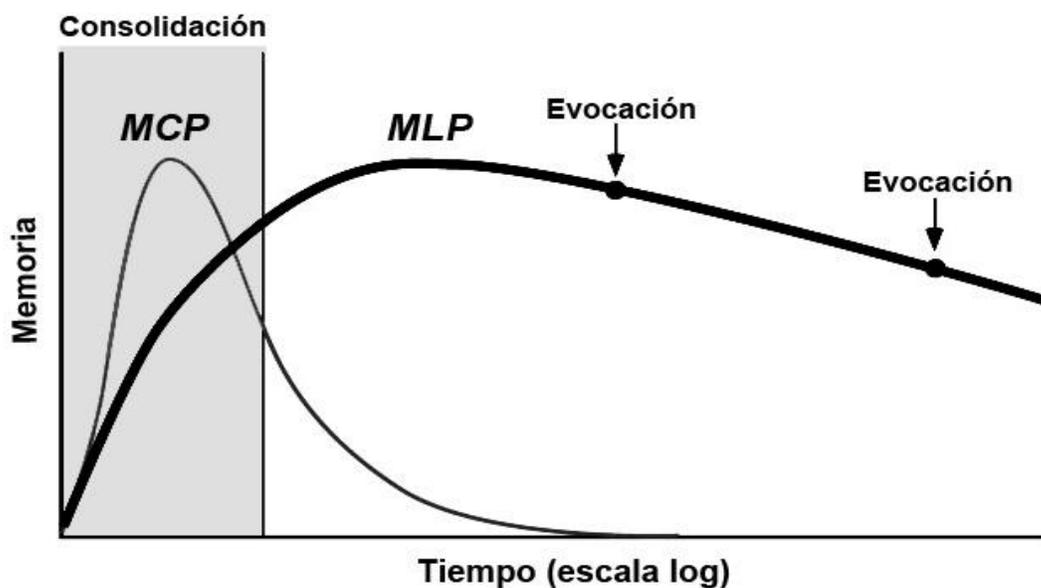


Figura 1. Representación gráfica en la que se ejemplifica la manera estándar en que se conceptualiza la consolidación. El proceso de consolidación ocurre solo para la memoria de largo plazo y permite que sea estable en el tiempo (Modificado de Dudai, 2004).

2.2 Hipótesis acerca de la consolidación

Los trabajos experimentales publicados en 1900 por los alemanes Müller y Pilzecker llevaron a acuñar el término conocido como consolidación (Lechner *et al.*, 1999). Éste es un proceso por el cual la información almacenada se estabiliza en un trazo de memoria que se fortalece a través del tiempo y se vuelve resistente a la interrupción (Dudai, 2004). Se ha demostrado experimentalmente que distintos tratamientos, como los choques electroconvulsivos o la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas (ISPs), pueden interrumpir este proceso. Los primeros estudios de este tipo, fueron reportados a finales de la década de 1940 por Duncan, quien reportó que la aplicación de choques electroconvulsivos después del entrenamiento produce un deterioro en la memoria. Sin embargo, cuando el mismo tratamiento fue aplicado en momentos progresivamente más distantes en el tiempo al entrenamiento, los animales mostraron una reducción significativa y gradual en el deterioro de la memoria (Duncan, 1949).

La hipótesis de la consolidación de la memoria es hasta ahora la visión más aceptada para explicar el almacenamiento de información a largo plazo. El proceso celular detrás de una MCP implica sólo la activación de cascadas de transducción de señales, es decir, un proceso por el cual una célula transforma una señal extracelular en una respuesta intracelular. Para la conversión a MLP las señales de transducción llegan hasta al núcleo celular, en donde se lleva a cabo la transcripción, y posteriormente la traducción del ARN, finalmente se lleva a cabo la síntesis de nuevas proteínas, la cual es responsable de alteraciones temporales de la transmisión sináptica que inducen modificaciones persistentes de la arquitectura sináptica. A esto se le conoce con el nombre de consolidación celular o sináptica (Debiec *et al.*, 2002).

2.3 Consolidación: La síntesis de proteínas

Katz y Halstead, plantearon en 1950 que el trazo de memoria debía ser mantenido por macromoléculas de gran importancia biológica tales como los ácidos nucleicos o proteínas. Flexner y colaboradores (1963) decidieron investigar si la permanencia de la memoria de largo plazo estaba relacionada con las proteínas. Sus descubrimientos impulsaron los primeros estudios realizados en la década de 1960 que exploraron el papel de la síntesis de proteínas en la consolidación de la memoria (Flexner *et al.*, 1963). En estos trabajos se inyectaron

sistémicamente o intracerebralmente fármacos ISPs algunos minutos después del entrenamiento (Agranoff *et al.*, 1965).

Un ejemplo de estos estudios es el trabajo de Barondes y Cohen (1967). Los autores administraron acetocicloheximida, un potente inhibidor de la síntesis de proteínas (véase tabla 1), en el cerebro de ratones 5 horas antes del entrenamiento en una tarea de laberinto en T. Los animales aprendieron que podían evitar una descarga eléctrica si se trasladaban a un brazo específico del laberinto. Los autores observaron que cuando la prueba se realizó 3 horas después del entrenamiento no hay efecto por la aplicación del fármaco en el desempeño de la tarea; sin embargo, pruebas realizadas 24, 96 y 168 horas después del entrenamiento mostraron un claro deterioro de la memoria. La conclusión a la que llegaron los autores fue que la síntesis de proteínas no es necesaria a corto, pero si a largo plazo. Cabe destacar que en este estudio se reportó un porcentaje de inhibición de la síntesis de proteínas mayor al 90% y con una duración de aproximadamente 3 horas (Barondes *et al.*, 1967). Como conclusión de estos trabajos, se encontró que la administración de los ISPs han revelado un deterioro en la formación de la memoria de largo plazo pero no en la de corto plazo; además, se reportó que el efecto amnésico es dependiente del momento de la administración, ya que entre menor es el intervalo entre la experiencia de aprendizaje y la aplicación del fármaco, mayor es la interferencia con la consolidación de la memoria, llegándose a un intervalo en que ya no se observan efectos sobre la memoria. También se ha encontrado que la aplicación de ISPs inmediatamente antes del aprendizaje no produce deficiencias en la MCP (Agranoff *et al.*, 1965; Barondes *et al.*, 1967). En la tabla 1 se muestran algunos de los fármacos que se han empleado en la investigación acerca de la consolidación de la memoria.

Una gran cantidad de información ha demostrado que la aplicación de los ISPs bloquea la formación de MLP. Por ejemplo, se ha reportado que la inhibición de síntesis bloquea la MLP de la memoria de reconocimiento de objetos en ratas (Lima *et al.*, 2009) y el aprendizaje de aversión a los sabores en ratas (Rosenblum *et al.*, 1993; Bahar *et al.*, 2003) y en pollos (Mileunisc *et al.*, 2005), entre muchas otras. Por ello es que se ha aceptado que la síntesis de proteínas es un requisito necesario y evolutivamente conservado en la consolidación de la memoria, puesto que se ha encontrado que ocurre tanto en especies de vertebrados como de invertebrados (Freeman *et al.*, 1995; Ezzeddine y Glanzman, 2003; Watanabe *et al.*, 2005). Esto

apoya la hipótesis de que la síntesis de proteínas es necesaria solo para la consolidación y no para ningún otro proceso relacionado con la misma (Davis y Squire, 1984).

TABLA 1. PRINCIPALES INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS MÁS UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN ACERCA DE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA

<i>Fármaco</i>	<i>Proceso afectado</i>	<i>Sitio de acción</i>
Actinomicina D	Transcripción y replicación del ADN	Se une al ADN en el inicio de la transcripción y evitando así la elongación por la ARN polimerasa.
Puromicina	Elongación (Traducción)	Estructura similar al aminoacil-ARNt de la tirosina. Por tanto, se enlaza al sitio A del ribosoma y participa en la formación de enlaces peptídicos, produciendo peptidil-puromicina. Sin embargo, no toma parte en la traslación y se desacopla rápidamente del ribosoma, causando una terminación prematura de la síntesis del polipéptido.
Cicloheximida y Acetocicloheximida	Elongación (Traducción)	Actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S en células eucariotas.
Emetina	Traducción	Inhibe la traslocación de peptidil-tARN desde el sitio de unión en el ribosoma. Interfiere en el alargamiento de la cadena polipeptídica, bloqueando la síntesis proteínas en células eucariotas.
Anisomicina	Traducción (Formación de los enlaces peptídicos)	Se une a la subunidad 60S del ribosoma e impide la unión peptídica y consecuentemente la elongación de la cadena polipeptídica e inhibe a la peptidil transferasa.

Tabla 1. Se resumen los principales inhibidores de la síntesis de proteínas que más se han empleado en la investigación acerca de la consolidación de la memoria (Modificado de Mileunisc, 2004).

En diversos estudios, los resultados obtenidos con estos fármacos parecen alentadores, ya que se obtiene una alta inhibición de la síntesis de proteínas; sin embargo, se requieren de dosis efectivas que resultan, en la mayoría de los casos, ser tóxicas para los animales (Mileunisc, 2004). Entonces un grupo de investigadores introdujeron en este campo un fármaco que al parecer supera las dificultades previas: la anisomicina (Flood *et al.*, 1973). Este fármaco resultó ser un excelente agente amnésico a dosis efectivas que no son tóxicas, además de que se puede administrar de manera repetida. La anisomicina es un inhibidor potente, estructuralmente específico y reversible que bloquea la actividad metabólica de las peptidil transferasas, las cuales son enzimas que catalizan la adición de aminoácidos para la formación de péptidos durante la síntesis de proteínas. Con relación a esto, diversos grupos de investigación han estudiado a fondo las propiedades de la anisomicina, así como su contribución en el deterioro de la memoria durante diversos paradigmas de aprendizaje. En este sentido, se ha demostrado que este inhibidor tiene un periodo de actividad de varias horas, cuyo pico de acción para alcanzar la inhibición del 90% de la síntesis proteica está entre los 20 y 30 minutos después de su administración (Davis y Squire, 1984; Mileunisc, 2004). Recientemente se ha observado que la administración de anisomicina en diferentes regiones corticales, varía en cuanto a su periodo de actividad, dependiendo del tipo de administración que se realice. Por ejemplo, el efecto de la inyección local de anisomicina es revertido hasta por horas después de su administración, (Wanisch y Wotjak, 2008).

Se cree que estos tratamientos aplicados poco tiempo después del aprendizaje, y que afectan a la consolidación, interfieren con el desarrollo de modificaciones en la funcionalidad de las sinapsis, dependientes de esta síntesis de proteínas, para la estabilización de la memoria; a estas modificaciones se les conoce genéricamente como plasticidad sináptica. La plasticidad sináptica ha sido definida como cambios en la eficiencia sináptica que permiten el fortalecimiento de asociaciones entre neuronas (Lynch, 2004), o también como la propiedad de las sinapsis de modificar la eficiencia con la que se transmite información de una a otra neurona (Escobar y Derrick, 2007). En la actualidad se cree que la plasticidad sináptica es la base del almacenamiento de información en el cerebro (Escobar y Derrick, 2007).

En 1949 D. O. Hebb planteó que el almacenamiento permanente de la memoria en los circuitos debe darse mediante modificaciones en las sinapsis de las neuronas a través de cambios morfológicos y/o funcionales a consecuencia de la actividad sináptica (Cooper, 2005);

este último punto lo asentó en lo que hoy se conoce como el postulado de Hebb, que propone que si una neurona excita a otra de manera repetida y persistente, una o ambas células sufrirán procesos de crecimiento o cambios metabólicos que darán lugar a un aumento en la eficacia de la comunicación entre las dos (Cooper, 2005). Este principio fue el primero que proponía formalmente el almacenamiento de la memoria mediante cambios fisiológicos en el sistema nervioso (Cooper, 2005). Sin embargo, su propuesta no tuvo fuerte apoyo experimental hasta que, en 1973, Bliss y Lomo descubrieron la potenciación a largo plazo (Habib y Dringenberg., 2010). Estos autores aplicaron estimulación eléctrica breve de alta frecuencia (de 50 a 100Hz) en la vía perforante, y registraron la respuesta en el giro dentado del hipocampo de conejos, observando que la fuerte estimulación era capaz de generar un aumento en la eficacia sináptica que duró varias horas en el animal anestesiado, y meses en el animal atento (Squire y Kandel, 1999; Lynch, 2004). Nombraron a su descubrimiento potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés). Actualmente es el principal modelo experimental usado para estudiar los cambios asociados a la experiencia, el cual ha ayudado a comprender la naturaleza de los procesos mnémicos.

Interesantemente, la LTP se desarrolla en dos fases, la LTP temprana, de corta duración (1 a 3 horas; Blitzer *et al.*, 2005) e independiente de síntesis de proteínas, y la LTP tardía, que es más duradera que la LTP temprana (hasta meses en el animal vivo; Blitzer *et al.*, 2005), y depende de la síntesis de proteínas para su formación. Brevemente, para la LTP temprana es necesaria la activación de los receptores N-metil D-aspartato glutamatérgicos (NMDA) (aunque se han descrito formas de LTP que no dependen de la actividad de estos receptores; Lynch 2004), la entrada masiva de Ca^{2+} a la postsinapsis, y la activación de otras moléculas, como proteínas cinasas, las cuales ligan la actividad que induce la LTP con el encendido de la maquinaria celular de síntesis de proteínas (Blitzer *et al.*, 2005). Para la LTP tardía se requiere la activación de factores de transcripción, expresión de genes, y síntesis de proteínas (Malenka y Bear, 2004; Blitzer *et al.*, 2005). Por lo tanto, se especula que, dado que la MCP no necesita de la síntesis de proteínas, este tipo de memoria podría ser formada por mecanismos análogos a la LTP temprana, mecanismos que involucran fundamentalmente cambios en proteínas ya existentes (Martín *et al.*, 2000).

Un estudio reciente realizado Cohen-Matsliah y colaboradores (2010) han propuesto que el aprendizaje induce una reducción en la hiperpolarización, que se manifiesta en la reducción del disparo neuronal en células del hipocampo y células piramidales de la corteza cerebral, que tiene una duración de varios días después de la adquisición. Asimismo los autores demostraron que aplicando una estimulación eléctrica breve de alta frecuencia semejante, a la que se utiliza para generar LTP, se puede inducir una reducción en la hiperpolarización en neuronas cultivadas del hipocampo. Esta reducción en la hiperpolarización se mantiene por varias horas semejantes una LTP tardía, lo cual este estudio permite sugerir que es dependiente de síntesis de proteínas.

Los resultados demostraron que aplicando una estimulación de alta frecuencia (20 estímulos que fueron aplicados en frecuencias de 50 Hz), induce una hiperpolarización de corto plazo que puede ser transformada en una reducción de la hiperpolarización, que persiste por periodos prolongados alrededor de tres a cinco horas. Interesantemente se observó que los efectos de la anisomicina no ocurren, si esta es aplicada una hora después de la estimulación sináptica. Esto plantea la posibilidad de que la reducción de la hiperpolarización a largo plazo sea dependiente de la síntesis de proteínas, un requisito para llevar a cabo la consolidación sináptica. Aunado a lo anterior, debido a que la MLP requiere de esta síntesis de proteínas, es posible que su formación dependa de mecanismos análogos a aquellos que subyacen a la formación de la LTP tardía (Habib y Dringenberg, 2010).

2.4 ¿Es necesaria la síntesis de proteínas para la consolidación?

A pesar de la amplia evidencia que apoya la teoría de que la formación de la memoria de largo plazo requiere de síntesis de proteínas, ésta ha sido cuestionada por evidencias recientes. Algunos reportes demuestran que existen efectos inespecíficos producidos por los ISPs, los cuales podrían ser causa importante de los efectos amnésicos de estos fármacos (Martínez *et al.*, 1981). Uno de los primeros efectos inespecíficos descritos para los ISPs es su capacidad de inhibir la síntesis de catecolaminas y producir la acumulación de tirosina (Flexner y Goodman, 1975; Freedman *et al.*, 1982) y esto sugería que a estos efectos secundarios se debía la amnesia producida por los ISPs.

Un trabajo reciente realizado por el grupo de Paul E. Gold demuestra que hay efectos inespecíficos que pueden explicar, al menos parcialmente, el bloqueo de la MLP producido por

este tipo de fármacos. Este grupo descubrió que la administración de una dosis amnésica de anisomicina en la amígdala, produce un incremento en la liberación de noradrenalina, dopamina y serotonina, muy por encima de los niveles basales medida en el sitio de la infusión (hasta un 17,000 %) (Canal y Gold, 2007; Canal *et al.*, 2007). También reportaron que, además de la amnesia y la liberación masiva de los neurotransmisores descritos, el mismo tratamiento induce la liberación exagerada de acetilcolina en el hipocampo (Qi y Gold, 2009). El bloqueo de los receptores a noradrenalina de la amígdala al momento de las inyecciones de anisomicina atenúa la amnesia producida por la anisomicina. Estos resultados sugieren que las inyecciones de este inhibidor en la amígdala interfieren con la formación de la memoria mediante la inducción de extensos cambios en los perfiles de liberación de noradrenalina, dopamina, serotonina y acetilcolina (Canal *et al.*, 2007; Qi y Gold, 2009). Otras evidencias sugieren también que bajo determinadas modificaciones a las tareas de aprendizaje, como un mayor número de ensayos (Barondes y Cohen, 1967; Flood *et al.*, 1975) o el incremento en la intensidad del entrenamiento (Flood *et al.*, 1972), la administración de ISPs no tienen efecto sobre la consolidación de la memoria.

2.5 Efecto protector del aprendizaje incrementado

Durante mucho tiempo, en nuestro laboratorio hemos estado interesados en el efecto protector del entrenamiento incrementado contra tratamientos que normalmente son amnésicos. Una experiencia incrementada de aprendizaje, es decir, una situación donde un individuo recibe un mayor número de sesiones de entrenamiento o intensidades de estimulación relativamente altas (sobrerreforzamiento) bloquean el efecto de tratamientos experimentales que interfieren con el proceso de consolidación.

Los primeros estudios en relación con la protección de la memoria inducida por alto nivel de entrenamiento fueron descritos en la década de los setenta. Prado-Alcalá *et al.* (1972) administraron atropina en el núcleo caudado de gatos y midieron sus efectos sobre la retención de una tarea instrumental reforzada positivamente (presionar una palanca para recibir leche) y se encontró un fuerte efecto amnésico. En esta misma época, también se describió, por primera vez, que cuando esta tarea instrumental es sobreentrenada, el bloqueo colinérgico del caudado ya no interfiere con la MLP de esa tarea (Prado-Alcalá *et al.*, 1977). Posteriormente, este grupo de trabajo encontró el mismo efecto protector al inyectar un antagonista colinérgico en el

estriado de ratas entrenadas en un aprendizaje de alternancia espacial reforzado positivamente (Prado-Alcalá *et al.*, 1978). Con el transcurso de los años, se ha demostrado el efecto protector de la memoria en otra tarea de aprendizaje denominada evitación inhibitoria (EI), también designada como prevención pasiva (Prado-Alcalá *et al.*, 2007). Esta tarea consiste en colocar a un roedor en un compartimiento iluminado, separado por una puerta deslizable de otro compartimiento oscuro; debido a su fotofobia innata el roedor cruza al compartimiento oscuro. Una vez que ha cruzado, se le administra un choque eléctrico en las patas. Cierta tiempo después (minutos, horas o días) se repite el procedimiento, pero omitiendo el choque y se puede observar que el animal no pasa (o pasa después de una gran latencia) de nuevo al comportamiento oscuro. Esta conducta de inhibición motora implica que la rata almacenó en la MLP la experiencia de aversión (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998).

De acuerdo con Mowrer (1951) la tarea de EI tiene componentes de aprendizaje tanto clásico como instrumental. Los cambios de conducta que ocurren durante la sesión de entrenamiento dependen de un condicionamiento clásico, debido a que se asocia el choque eléctrico con el compartimiento oscuro en donde se recibió ese estímulo nociceptivo. El animal asoció el miedo a un estímulo neutral, que es el contexto. El animal, motivado por el miedo, emite una gran cantidad de respuestas (chillidos, saltos, micción, defecación) hasta que presenta la respuesta correcta que lo lleva escapar del choque. Durante la sesión de prueba, el animal ejecuta la respuesta instrumental, que consiste en la inhibición motora, por lo que al evitar trasladarse al compartimiento en el que recibió el choque, su respuesta es reforzada por la ausencia del estímulo nociceptivo.

Para la tarea de EI, aún se desconoce el circuito del almacenamiento de la información, debido a que se trata de un conjunto complejo de asociaciones; sin embargo, se ha comprobado ya la participación de varias estructuras cerebrales, lo que una vasta literatura así lo demuestra (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 2000; McGaugh, *et al.*, 2002). Estas estructuras se mencionan a continuación: el estriado (Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989), la amígdala (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991), el hipocampo (Izquierdo *et al.*, 1992), la sustancia negra compacta (Cobos-Zapíaín *et al.*, 1996), el núcleo basal magnocelular (López-García *et al.*, 1993), la corteza insular (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991; Miranda y McGaugh, 2004). Recientemente se reportó que la corteza medial prefrontal y la corteza cingulada anterior son regiones posiblemente implicadas en la formación de la MLP de esta tarea (Zhang *et al.*, 2011).

Prado-Alcalá y colaboradores encontraron que existe un efecto protector producido por el entrenamiento incrementado en la tarea de EI, que impide la amnesia que comúnmente se produce con la administración sistémica de escopolamina, (antagonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina) (Cruz-Morales *et al.*, 1992; Duran-Arévalo *et al.*, 1990). Este efecto protector del entrenamiento incrementado también ha sido corroborado en estructuras, que son indispensables para el establecimiento de la memoria de esta tarea, como la sustancia nigra (Cobos-Zapiain *et al.*, 1996), el estriado (Díaz del Guante *et al.*, 1990) y el hipocampo (Quiroz *et al.*, 2003).

Un estudio reciente demostró que la administración subcutánea de cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas) 30 minutos antes o inmediatamente después del entrenamiento con intensidades bajas de choques eléctricos produce un deterioro en la memoria cuando se realizó la evocación a las 24 horas, en contraste con los animales sometidos a un entrenamiento incrementado (administración de choques de intensidad más alta) en los que no se presentó este efecto (véase la figura 2) (Díaz-Trujillo *et al.*, 2009). Asimismo hemos demostrado que la administración de anisomicina en el hipocampo dorsal, 15 minutos antes del entrenamiento con intensidades bajas de choques eléctricos produce deterioro en la MLP. En cambio, con intensidades mayores no se presentó ese efecto, como se muestra en la figura 3 (Rodríguez-Serrano, 2010). Algunos estudios previos sugieren que en ratones que fueron entrenados en la tarea de EI, el efecto amnésico producido por la administración de ISPs administrado 15 minutos antes del entrenamiento se reduce cuando se aumenta la intensidad de la estimulación aversiva (Flood *et al.*, 1972; Flood *et al.*, 1973; Quartermain y McEwen, 1970).

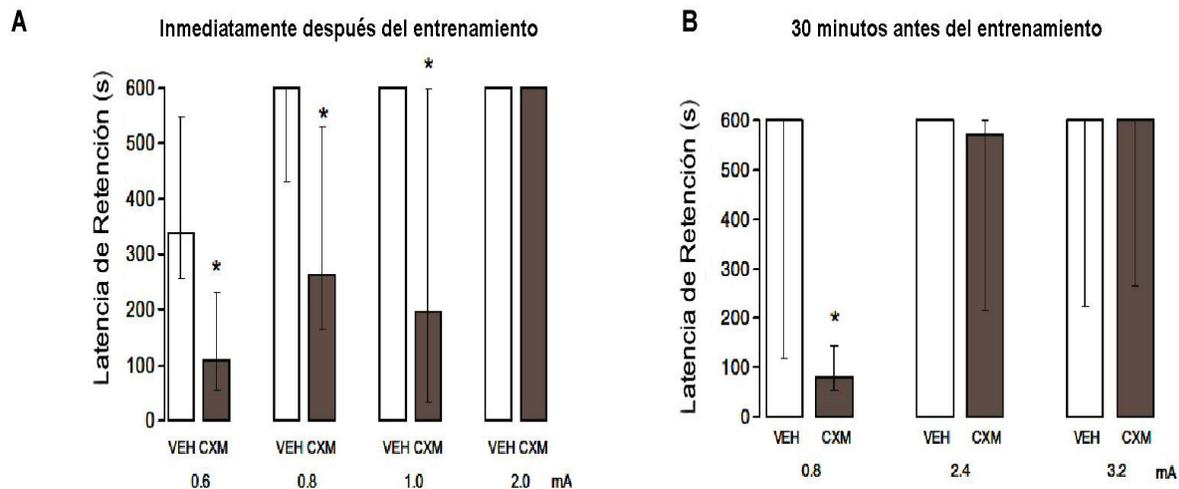


Figura 2. A. Se muestran medianas y percentiles de las latencias en grupos de animales a los que se administró, subcutáneamente, 2.8 mg/Kg de cicloheximida (CXM) o solución vehículo (VEH) inmediatamente después del entrenamiento. En el eje de las abscisas se indican las intensidades de choque utilizadas aplicadas a cada grupo de animales. En el día de la prueba, 24 horas después, se observó una deficiencia significativa en la retención (memoria de largo plazo) en los grupos entrenados con las intensidades más bajas, pero no en el entrenado con la mayor de intensidad de choque. **B.** En el mismo estudio, grupos de animales a los que se administró, subcutáneamente, 2.8 mg/Kg de CXM o VEH 30 minutos antes del entrenamiento presentan deterioro en la MLP cuando fueron entrenados con la menor intensidad pero no los de mayores de intensidades de choque. (* $p < 0.05$ comparado con respecto con el VEH) (Modificado de Díaz-Trujillo *et al.*, 2009).

En síntesis, se ha demostrado que la consolidación de la memoria depende del funcionamiento neuronal normal, así como de la experiencia, de tal manera que cuando se interfiere con el funcionamiento neuronal (por alguna lesión o por una manipulación farmacológica en determinada región cerebral) antes o inmediatamente después de la adquisición de la tarea, se interfiere con la consolidación de la memoria. Sin embargo, cuando se incrementa el aprendizaje por un mayor número de sesiones de entrenamiento (sobrentrenamiento) o por una mayor intensidad de estimulación (sobrerreforzamiento), dicha interferencia en la consolidación no se presenta, por lo que hay un efecto protector del aprendizaje incrementado ante tratamientos amnésicos. En otras palabras, si el sujeto es sometido a una experiencia incrementada de aprendizaje, probablemente las estructuras cerebrales implicadas en el proceso de consolidación sufren un arreglo funcional en paralelo con otras estructuras que se sabe participan en el establecimiento de la memoria de la tarea EI (Prado-Alcalá *et al.*, 2007).

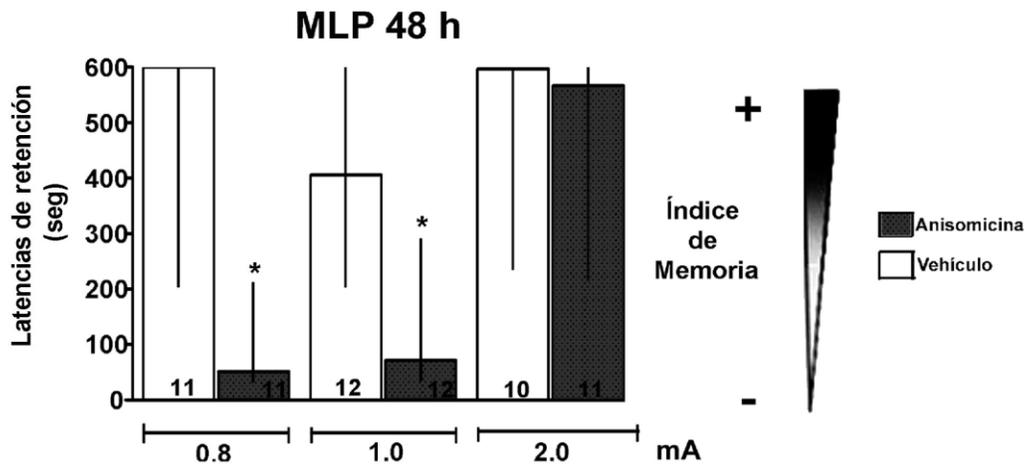


Figura 3. Se muestran medianas y percentiles de las latencias en grupos de animales a los que se administró anisomicina o solución vehículo en el hipocampo dorsal 15 min antes del entrenamiento. En el eje de las abscisas se indican las intensidades de choque utilizadas aplicadas a cada grupo de animales. En el día de la prueba, 48 horas después, se observó una deficiencia significativa en la retención (memoria de largo plazo) en los grupos entrenados con las intensidades más bajas, pero no en el entrenado con la mayor de intensidad de choque. (* $p < .05$ comparado con respecto con el vehículo) Para mayor claridad en el lado derecho se muestra un índice de arbitrario de memoria (Modificado de Rodríguez- Serrano, 2010).

2.6 La corteza insular: organización estructural

La corteza insular (CI) es una región que está relacionada con el procesamiento y almacenamiento de la información gustativa. En el cerebro de la rata, se encuentra en la superficie lateral del hemisferio cerebral, en la región dorsal del *surco rinal rostral* a la *corteza perirrinal*, por donde cruza la *arteria cerebral media*.

Histológicamente se divide en tres regiones, granular, agranular y disgranular, debido a la presencia o ausencia relativa de neuronas granulares (véase en figura 4). En ratas, la CI comprende un área de 3 mm y 1 mm por encima y a lo largo del surco rinal alrededor de la arteria media (Braun *et al.*, 1982).

La región disgranular está relacionada con el sistema gustativo (Yamamoto *et al.*, 2006). Es una estructura importante tanto para la detección del sabor como de los efectos viscerales posteriores. La corteza gustativa (CG) presenta conexiones recíprocas con la amígdala y con el núcleo parabraquial.

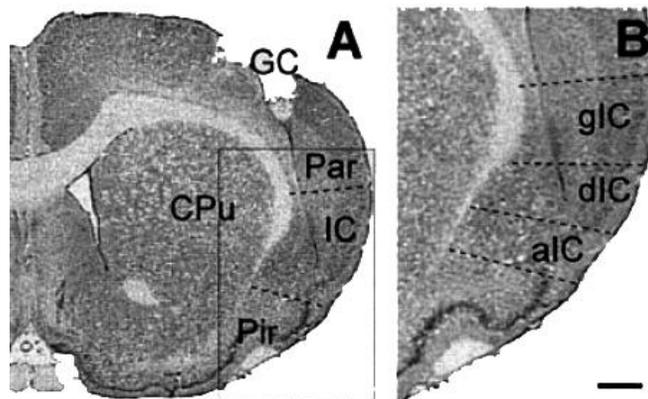


Figura 4. Sección frontal del hemisferio izquierdo del cerebro de la rata. **(A)** Se muestra el área correspondiente a la corteza insular (IC) y otras regiones como la corteza gustativa (GC), caudado putamen (CPU), la corteza parietal (Par) y la corteza piriforme (Pir). **(B)** Representación de las capas de la corteza insular en rata: gIC, capa granular; dIC, capa disgranular; aIC, capa agranular. Sección Coronal + 1.2 mm de Bregma del Atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998). (Modificado de Ferreira *et al.*, 2002).

La organización celular de la corteza insular se compone de tres regiones continuas de corteza divididas. La porción ventral contiene a la corteza agranular mientras que la ínsula caudal es granular. Entre estas dos regiones se ubica una zona de transición disgranular (Mesulam y Mufson, 1982). La corteza de la ínsula ventral consiste de tres estratos celulares, los cuales contienen agregados de células no granulares.

La CI se divide en regiones a lo largo del eje anterior-posterior y en diversas zonas que se distinguen por la densidad de células granulares en las capas II y IV. En primer lugar, la CI anterior que tiene las zonas granular, disgranular, y agranular, se proyecta hacia la corteza motora y al núcleo accumbens. Caudalmente se encuentran dos áreas sensoriales insulares relacionadas, la corteza insular posterior y parietal, ambas con zonas granulares, disgranulares, y agranulares. La CI posterior recibe la entrada del tálamo gustativo y del complejo parabraquial, así como proyecciones de la CI anterior y a la extensión amigdalina (Shi y Casell, 1998).

La CI tiene conexiones recíprocas con el área somatosensorial secundaria, el núcleo del tracto solitario, el núcleo parabraquial, el tálamo y la amígdala. Recibe también aferentes que provienen del *locus coeruleus* y tiene eferentes que proyectan hacia el estriado, el núcleo accumbens, el claustro, el presubiculum y las cortezas prefrontal, perirrinal, entorrinal y

piriforme determinadas mediante los métodos de trazado anterógrado y retrógrado (Bures *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 1986; Wright y Groenewegen, 1996) (véase en figura 5).

Existen también interconexiones entre las diferentes áreas de la corteza insular: la parte granular proyecta hacia la parte disgranular subyacente. La corteza disgranular, a su vez, proyecta hacia las áreas agranular y granular. La corteza agranular posterior tiene eferentes hacia el área agranular anterior y hacia las áreas granular y disgranular posteriores. Las áreas granular y disgranular posteriores proyectan hacia la disgranular anterior (Shi y Cassell, 1998).

Estudios electrofisiológicos en ratas realizados por Yamamoto *et al.* (1989) muestran que la corteza insular disgranular presenta características diferenciales en cuanto a la estimulación gustativa por medio de un sabor determinado. Las neuronas que se estimulan preferentemente con un sabor dulce se encuentran en la parte rostral, y con quinina primordialmente en la región caudal y en la región granular. Esto ha sugerido que la CI es una región de percepción gustativa, que no está exenta de recibir otro tipo de información sensorial, por lo que es considerada como una estructura multimodal en donde se procesan las señales sensoriales.

La CI recibe proyecciones de neuronas colinérgicas provenientes principalmente del núcleo Basalis Magno Celularis (NBM) y de fibras glutamatérgicas provenientes de amígdala, tálamo y de conexiones corticocorticales (Davis *et al.*, 1994). Existe evidencia de que algunos de estos sistemas de neurotransmisión tienen un papel en el establecimiento de la memoria gustativa (Bermudez Rattoni, 2004). Por ejemplo, en un estudio realizado por Berman y colaboradores (2000), se probó el efecto de la microinyección en la corteza insular de agonistas y antagonistas de neurotransmisores y de neuromoduladores identificados en la activación de cinasas¹ ERK1-2 (Extracellular signal regulated kinases) ante un sabor novedoso y en la adquisición de la memoria gustativa. Se encontró que los receptores NMDA, metabotrópicos glutamatérgicos, muscarínicos, beta-adrenérgicos y dopaminérgicos contribuyen a la adquisición de las memorias gustativas recientes, pero no a su evocación. Además, sólo las vías de entrada glutamatérgicas y colinérgicas funcionan específicamente en la activación ante estímulos novedosos, dependientes de ERK1-2 en la corteza insular. Los resultados de estos experimentos sugieren que el nivel de actividad basal de ERK1-2 en la corteza insular se mantiene por el equilibrio entre las entradas glutamatérgicas, dopaminérgicas y GABAérgicas.

¹ Proteínas cinasas. Enzimas que transfieren grupos fosfato (cedidos por la molécula trifosfato de adenosina o ATP) uniéndose a ciertas proteínas de manera tal que la función de dicha proteína se modifica. (Alberts *et al.*, 2002)

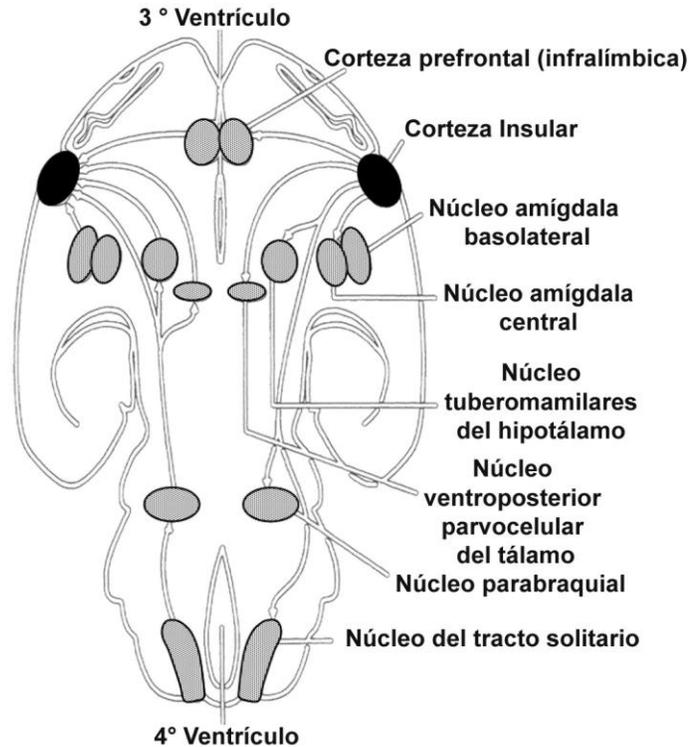


Figura 5. Diagrama esquemático de un corte horizontal de las principales de las proyecciones aferentes y eferentes a la corteza insular (Modificado de Cechetto y Saper, 1990).

Aferentes	Eferentes
Núcleo lateral y basolateral de la amígdala	Núcleo central de la amígdala
Núcleo basal magnocelular	Estriado
Núcleo centromedial del tálamo	Claustro
Área ventral tegmental	Parte lateral del núcleo del lecho de la estría terminal
Núcleos del rafé	Núcleo accumbens
<i>Locus coeruleus</i> , bilateral	Corteza entorrinal
Núcleos tuberomamilares del hipotálamo, Bilaterales	Presubiculum

Tabla 2. Principales proyecciones aferentes y eferentes a la corteza insular (Adaptado de Sabath, 2008).

2.7 Corteza insular y memoria de largo plazo.

La intervención de la corteza insular en la tarea de EI es un caso interesante, ya que anteriormente se hacía referencia a ella casi sólo por su papel en el procesamiento de la información visceral y gustativa (Bures *et al.*, 1998). Se le atribuye una gran diversidad de funciones, entre ellas olfacción, gusto, control visceral, procesamiento somatosensorial y nociceptivo; Así como también la memoria (Afifi y Bergman, 2005; Swards y Swards, 2002). Se cree que interviene en la representación de información con contenido emocional influidos por entradas sensoriales específicas, especialmente aquellas reforzadas o mediadas por situaciones aversivas (Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001). En este sentido, se ha encontrado que al lesionar la corteza insular se impide la formación de ciertos aprendizajes que tienen algún componente emotivo, como la evitación inhibitoria y el laberinto acuático (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991). Participa también en la formación del condicionamiento de aversión al sabor (Miranda y McGaugh, 2004) y en el procesamiento de estímulos visuales aversivos (Perlis *et al.*, 2008). Y es recientemente, cuando se han encontrado evidencias de su participación en otro tipo de memorias no emotivas, como el reconocimiento de objeto (Bermúdez-Rattoni *et al.*, 2005).

Uno de los modelos más utilizados para evaluar el papel de la corteza insular es el aprendizaje de aversión a los sabores. En la tarea de aprendizaje de aversión a los sabores se ha demostrado que el bloqueo de los receptores NMDA interrumpe la formación de la memoria en las fases iniciales (adquisición y consolidación temprana), pero no la consolidación o la evocación, sugiriendo que estos receptores están involucrados en los procesos tempranos que tienen lugar durante la formación y recuperación de la memoria por condicionamiento del sabor (Gutiérrez *et al.*, 1999). Ferreira y colaboradores (2002), demostraron que la administración de un antagonista de receptores de acetilcolina (escopolamina) en la corteza insular, antes, pero no después, o en el intervalo entre el estímulo condicionado y el incondicionado, produce un deterioro significativo en las memorias de corto y largo plazo del aprendizaje de aversión a los sabores.

Se ha demostrado también que la administración de un antagonista de receptores muscarinico de acetilcolina como la oxotremina o el 8-Br-cAMP, un análogo del segundo mensajero cAMP en la corteza insular después de un entrenamiento en pruebas de EI y durante la adquisición y consolidación del aprendizaje de aversión a los sabores. La infusión post-

entrenamiento en CI de 0.3 μg oxotremorina y de 1.25 μg de 8-Br-AMP incrementó la retención de la tarea de EI. Infusiones de 8-Br-AMP, pero no de oxotremorina, en CI incrementaron la retención del CAS. En este estudio también se examinó si la actividad noradrenérgica en la amígdala basolateral para ambos tipos de condicionamiento, era crítica para el incremento en la retención de la memoria. En ambos casos la infusión ipsilateral de propanolol, un antagonista beta adrenérgico, administrado en la amígdala basolateral bloqueó el efecto que la administración de 8-Br-cAMP y oxotremorina producían en la corteza insular. Esto sugiere que dicha corteza está implicada en la consolidación de la memoria en pruebas del CAS o de EI, y que este efecto requiere una actividad noradrenérgica en la amígdala basolateral (ABL). El incremento observado en la consolidación de la memoria de EI con infusiones post-entrenamiento de oxotremorina sugiere la participación del sistema colinérgico en la CI durante la consolidación de la memoria (Miranda y McGaugh, 2004). Aportan evidencia adicional que señala que la amígdala basolateral está implicada en la regulación de la consolidación y el almacén de la memoria en otras regiones del cerebro, incluyendo la CI y que se requiere una ABL intacta (Roosendaal *et al.*, 2001).

Actualmente se ha avanzado mucho en dilucidar cuál es el papel que juega la corteza insular en el reconocimiento de sabores; sin embargo son pocos los trabajos en donde se le relaciona en menor o mayor grado con la memoria de reconocimiento visual. Por ello es que diversos investigadores se han dado a la tarea de indagar la función de la corteza insular en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, una tarea basada en la tendencia de los roedores por explorar objetos novedosos que no le resultan familiares. Esta tarea consiste de manera general en presentar a un animal dos objetos iguales para que los puedan explorar por un determinado tiempo. Después se le presenta al animal una copia antes presentada y un objeto nuevo. Se mide el tiempo de exploración de cada objeto para determinar si el animal muestra preferencia por el objeto novedoso sobre el familiar (Ennaceur y Delacour, 1988). Bermúdez-Rattoni y colaboradores (2005) encontraron que la aplicación de un antagonista de receptores muscarínicos como la escopolamina en la corteza insular, después del entrenamiento en pruebas de exploración ante estímulos novedosos, hechos en roedores, producía un deterioro en la memoria de reconocimiento de objetos.

Por otra parte, Balderas y colaboradores (2008) demostraron que la administración de anisomicina. Este fármaco bloquea reversiblemente la síntesis de proteínas, a través de la inhibición de la traducción de ARNm, que interrumpe la reacción de la peptidil transferasa (Iordanov *et al.*, 1997). La aplicación de este fármaco en las cortezas insular y corteza perirrinal, así como otras regiones, como en el hipocampo dorsal y la (ABL), inmediatamente después de la adquisición en las tareas de reconocimiento de objetos y una variante de la misma tarea, que implica el reconocimiento de objetos dentro de un contexto, producía un deterioro consolidación de la memoria de reconocimiento para estímulos individuales (tarea de reconocimiento de objetos), en grupos independientes de animales que fueron implantados en las cortezas insular y perirrinal. Mientras que el grupo de animales que fueron implantados en el hipocampo, presentaron solo deterioro en la MLP en el reconocimiento a estímulos dentro de un contexto específico (tarea de reconocimiento de objetos en contexto). Y en el caso de la ABL, se sugiere al parecer no tiene ninguna participación en la consolidación de estas dos tareas.

En experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio hemos encontrado que en la tarea de EI la administración, inmediatamente después del entrenamiento, de distintas dosis de anisomicina produce amnesia del aprendizaje de evitación inhibitoria con dosis bajas de (15.5 μg y 31.25 μg), pero no con dosis mayores (93.7 μg) (Huchín-Ramírez, 2007) (véase figura 6). Esto sugiere la posibilidad de que la falta de efecto amnésico de la dosis alta de anisomicina se deba a la producción de ERK1-2 inducida por dicha dosis (Igaz *et al.*, 2002).

Estos resultados proporcionan evidencia de que la CI no está ligada únicamente al aprendizaje asociativo y al reconocimiento de sabores, sino que desempeña un papel más general en la memoria de reconocimiento y es congruente con las evidencias de que lesiones reversibles o permanentes de la CI producen un fuerte deterioro en la consolidación de la EI y el aprendizaje espacial del laberinto acuático (Bermúdez-Rattoni y McGaugh, 1991; Bermúdez-Rattoni *et al.*, 1991)

Hasta ahora, no se ha determinado si el aprendizaje incrementado en la tarea de evitación inhibitoria impide el efecto amnésico producido por la inhibición de la síntesis de proteínas en la CI. En consecuencia, el propósito del presente estudio es comprobar esa posibilidad, para así determinar el grado de generalización de este fenómeno, como se ha demostrado en el hipocampo, estriado y sustancia negra compacta.

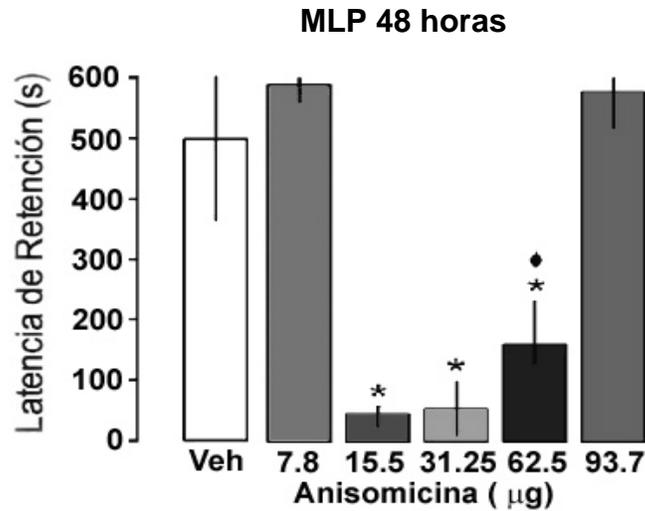


Figura 6. El eje de las ordenadas representa las medianas de las latencias de retención obtenidas a las 48 horas después del entrenamiento en la tarea de EI expresadas en segundos. A grupos independientes de ratas se les inyectó, en la corteza insular, la solución de vehículo (Veh), o una de las dosis de anisomicina que se especifican debajo de cada barra; la línea en cada barra muestra los rangos intercuartiles. * $p < 0.0001$ en relación con los grupos administrados con vehículo o con y 93.7 μg de anisomicina. ♦ $p < 0.005$ en relación con los grupos inyectados con 15.5 y 31.25 μg . Nótese que la anisomicina en dosis de 93.7 no interfirió con la memoria en sujetos entrenados a con una intensidad de 1.0 mA (Modificado de Huchín-Ramírez *et al.*, 2007).

3. PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

- H1: La administración de anisomicina en la corteza insular después del entrenamiento incrementado no interferirá con la consolidación de la memoria del aprendizaje de evitación inhibitoria.
- H2: La administración de anisomicina en la corteza insular antes del entrenamiento incrementado no interferirá con la consolidación de la memoria del aprendizaje de evitación inhibitoria.
- H3: La administración de anisomicina en la corteza insular antes del entrenamiento incrementado no produce deterioro en la adquisición de la tarea de evitación inhibitoria.

3.2 Objetivo General

Evaluar si la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular produce deterioro de la consolidación de un aprendizaje incrementado de una tarea de evitación inhibitoria.

3.3 Objetivos Particulares

1. Determinar si el entrenamiento incrementado en una tarea de aprendizaje de evitación inhibitoria produce un efecto protector contra la amnesia producida por la administración de anisomicina en la corteza insular después del entrenamiento
2. Determinar si el entrenamiento incrementado en una tarea de aprendizaje de evitación inhibitoria produce un efecto protector contra la amnesia producida por la administración de anisomicina en la corteza insular antes del entrenamiento.
3. Evaluar si la administración de anisomicina en la corteza insular antes del entrenamiento afecta el proceso de adquisición de la tarea de evitación inhibitoria.
4. Evaluar si la administración de anisomicina en la corteza insular antes del entrenamiento presenta un aprendizaje por dependencia de estado.

4. MÉTODO

4.1 Sujetos

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a las regulaciones establecidas por “El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación de la Salud” de la Secretaría de Salud Pública y según la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 en materia de “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” y a las normas estipuladas en la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals del NIH (ILAR, 1996).

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 270-300 g de peso, obtenidas del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se mantuvieron en cajas individuales en un ambiente de 22 ± 1 °C con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (luz 7.00 a.m.), sin restricción de comida y agua. Todas las manipulaciones y procedimientos conductuales se realizaron durante la fase de luz.

4.2 Cirugía estereotáxica

Los animales fueron implantados por cirugía estereotáxica con cánulas bilaterales en la corteza insular, siguiendo las coordenadas: anterior 1.2 mm, lateral \pm 5.5 mm, y ventral 4 mm con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 1998), bajo anestesia con pentobarbital sódico (45 mg/Kg intraperitoneal) y atropina (0.4 mg/kg). Las cánulas se colocaron 2 mm arriba del área de interés para reducir posibles alteraciones por lesiones físicas, y se fijaron al cráneo mediante un soporte de dos tornillos y cemento dental. Las cánulas se protegieron de posibles obstrucciones con la colocación de estiletes de la misma longitud. El tiempo de recuperación post-quirúrgico antes de realizar el entrenamiento conductual se basa en reportes previos (Quiroz *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2007) y fue de cinco a siete días.

4.3 Aparatos

Las sesiones de entrenamiento y de prueba se realizaron en una caja de evitación inhibitoria compuesta por dos compartimentos del mismo tamaño (30x30x30 cm cada uno) separados por una puerta tipo guillotina. El compartimiento, “de seguridad”, estuvo iluminado por un foco de 10 Watts colocado en la tapa del compartimiento y con una rejilla en el piso. El otro compartimiento, “de castigo”, es relativamente oscuro y sus paredes laterales de acero inoxidable en forma de “V”, las cuales llegan al piso del compartimiento, permaneciendo separadas en este lugar por una distancia de 1.5 cm (justo a la mitad del compartimiento). Estas láminas pueden ser electrificadas por un estimulador de pulsos cuadrados (Grass Instruments Co., modelo S48G) acoplado a una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., modelo CCU-1). La duración de los estímulos, las latencias de entrada, de escape y de retención fueron medidas automáticamente con la ayuda de una computadora. La cámara de condicionamiento fue ubicada en un cuarto sonoamortiguado y oscuro provisto de un amortiguador de ruido (véase figura 7).

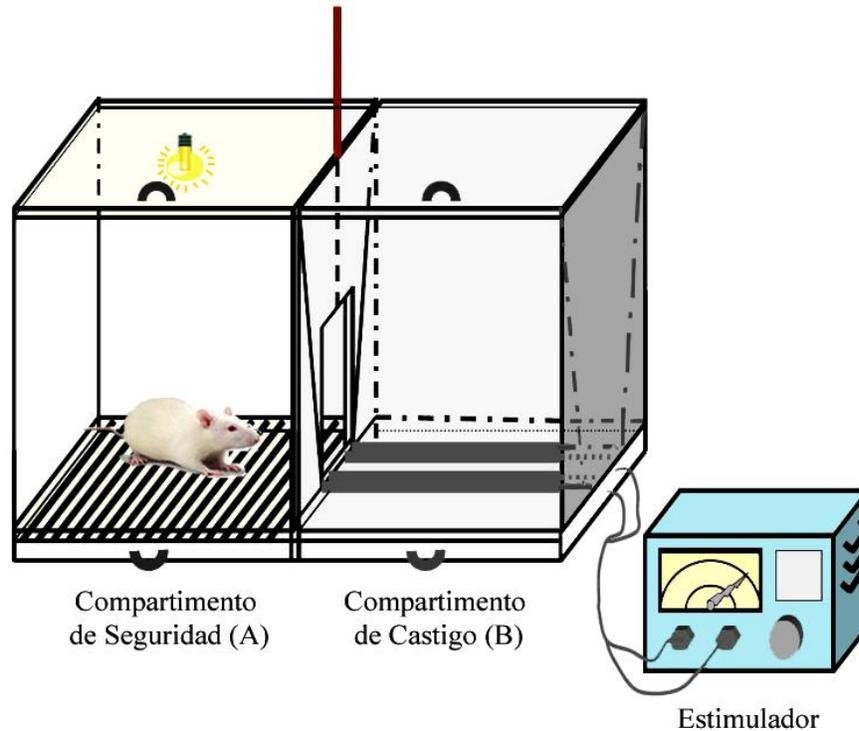


Figura 7. Cámara de evitación inhibitoria. El animal aprende a suprimir la tendencia natural por preferir los sitios oscuros sobre los bien iluminados, mediante el apareamiento de un choque eléctrico con un ambiente oscuro. El entrenamiento se lleva a cabo dentro de una cámara con dos compartimentos divididos entre sí por una compuerta que se desliza a manera de guillotina; uno de los compartimentos está bien iluminado (A). El otro compartimento es oscuro y tiene un piso metálico a través del cual se dan pequeñas descargas eléctricas (B).

4.4 Procedimiento conductual

Durante el entrenamiento cada animal fue colocado en el compartimento de seguridad de la cámara de condicionamiento, y diez segundos después la puerta de separación se abrió; la latencia para pasar al compartimento de castigo fue medida (latencia de entrada). Una vez en este compartimento la puerta se cerró y se aplicó una de distintas intensidades choque eléctrico (1.0, 3.0 ó 5.0 mA; pulsos cuadrados de 10 milisegundos de duración, frecuencia de 50 pulsos por segundo, y 100 voltios) a través del piso, durante 10 segundos. Al término de los primeros 5 segundos se abrió de nuevo la puerta y se midió la latencia de escape; después de 30 segundos se regresó el animal a su caja habitación. Cuarenta y ocho horas después del entrenamiento se realizó la prueba de retención (memoria de largo plazo). Esta sesión se realizó de la manera descrita para el entrenamiento, pero no se aplicó el choque eléctrico. Se midió el tiempo en que el animal demoró en pasar al compartimento de castigo (latencia de retención); si el animal no pasó en 600 segundos se dio por terminada la sesión.

4.5 Fármacos

Se utilizó anisomicina (2-[p-metoxibencil]-3,4-pirrolidinediol 3-acetato, C₁₄H₁₉O₄) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a la que se agregó una cantidad equimolar de HCl y se disolvió en solución salina isotónica ajustando después el pH a 7.4. La concentración que se administró inicialmente (31.25 µg/mL) está basada en un estudio previo del laboratorio (Huchín Ramírez, 2007). Este inhibidor de síntesis de proteínas es producido por la bacteria *Streptomyces griseus*. Inhibe la actividad de la enzima peptidil transferasa en los ribosomas (Pestka, 1971).

4.6 Administraciones

Durante al menos tres días previos a la inyección, los animales se manipularon durante 3 a 5 minutos para habituarlos al contacto con el investigador y disminuir un posible estado de estrés inducido por el procedimiento de la microinyección, y para valorar el estado de salud de los mismos. La manipulación consistió en sacar a la rata de su caja, revisar los tapones de las cánulas y sujetarla suavemente simulando la infusión de los tratamientos. En el último día se colocó un inyector falso con las medidas de la aguja que se emplearía durante la infusión (14 mm de largo, con un diámetro de 0.012 mm). Los fármacos se inyectaron bilateralmente, inmediatamente después del entrenamiento o 30 minutos antes del entrenamiento. Las inyecciones se administraron simultáneamente en ambos hemisferios mediante una aguja dental que fue introducida en cada cánula hasta llegar a la zona deseada; la aguja se conectó, a través de un tubo de polietileno, con jeringas marca Hamilton de 10 µL montadas en una bomba automática de inyección. El volumen administrado fue de 0.5 µL por hemisferio en un tiempo total de un minuto. Para facilitar la difusión del fármaco, los inyectores fueron mantenidos un minuto adicional dentro de las cánulas después de la inyección, de manera que todo residuo del fármaco fuera absorbido por el tejido.

4.7 Efecto de tratamientos post-entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

Durante el entrenamiento se utilizaron tres intensidades de choque: 1.0, 3.0 y 5.0 mA. Para cada intensidad hubieron dos grupos de ratas: inyectadas con vehículo, o inyectadas con una dosis 31.25 μg de anisomicina. Se administró el vehículo o anisomicina inmediatamente después del entrenamiento de la EI. La prueba de retención se realizó 48 horas después del entrenamiento (véase figura 8). El diseño experimental empleado fue de grupos independientes para cada intensidad de choque, como se muestran en la tabla 3.

TABLA 3. ADMINISTRACIÓN INMEDIATAMENTE DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO

Intensidad de choque	Relativamente bajo 1.0 mA	Relativamente alto 3.0 mA	Relativamente alto 5.0 mA
Dosis μg / 0.5 μL	31.25 (n=8)	31.25 (n=9)	31.25 (n=8)
	Vehículo (n=7)	Vehículo (n=6)	Vehículo (n=8)

Tabla 3. Diseño experimental de grupos independientes. Vehículo: grupos control, Anisomicina: Grupos con administración de anisomicina en una dosis de 31.25 $\mu\text{g}/0.5\mu\text{L}$, Las intensidades de choque en el entrenamiento fueron de 1.0, 3.0 y 5.0 mA. Entre paréntesis se indica el número de sujetos por grupo.

4.8 Efecto de tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

La inhibición de la síntesis de proteínas requiere 30 minutos para alcanzar su máximo nivel después de la inyección de anisomicina en la CI, de acuerdo al reporte de Roseblum y *colaboradores* (1993). Esta ventana temporal entre la inyección inmediatamente después del entrenamiento y el establecimiento de la inhibición de la síntesis de proteínas deja abierta la posibilidad de que el entrenamiento con los niveles altos de choque eléctrico produzca un aceleramiento de la consolidación de la memoria. Para explorar esta posibilidad se inyectó la anisomicina 30 minutos antes del entrenamiento, utilizando dos intensidades de choque

eléctrico: 1.0 y 5.0 mA. Para cada intensidad se inyectó vehículo o anisomicina simultáneamente inmediatamente antes del entrenamiento. La prueba de retención se realizó 48 horas después del entrenamiento (véase figura 8). El diseño experimental empleado fue de grupos independientes para cada intensidad de choque como se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. ADMINISTRACIÓN 30 MINUTOS ANTES DEL ENTRENAMIENTO

Intensidad de choque	Relativamente bajo 1.0 mA	Relativamente alto 5.0 mA
Dosis µg / 0.5 µL	31.25 (n=7)	31.25 (n=6)
	Vehículo (n=8)	Vehículo (n=7)

Tabla 4. Diseño experimental de grupos independientes. Vehículo: grupos control, Anisomicina: grupos con administración de anisomicina en una dosis de 31.25 µg/0.5µL, La intensidad de choque en el entrenamiento correspondió de 1.0 y 5.0 mA. Entre paréntesis se indica el número de sujetos por grupo.

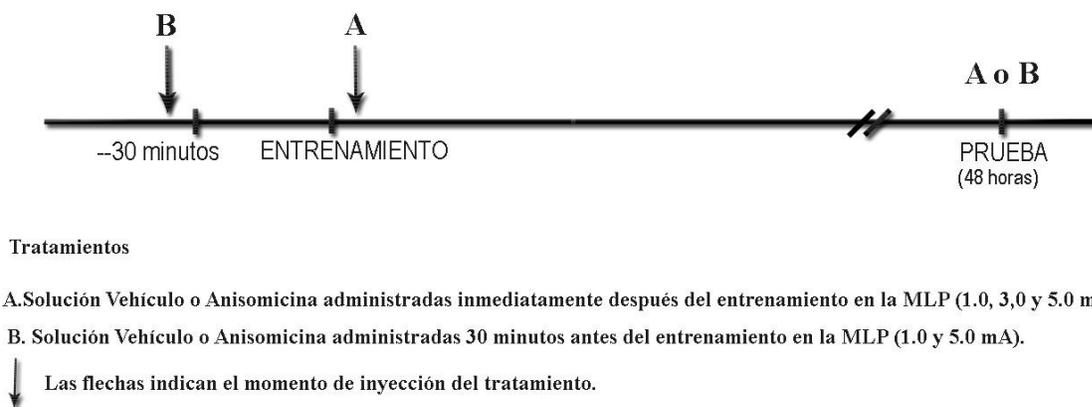


Figura 8. Tratamientos sobre la memoria de largo plazo (MLP).

4.9 Efecto de tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento y medición de la memoria de corto plazo

Para determinar si los efectos de la anisomicina administrada antes del entrenamiento se ejercen sobre la consolidación de la memoria o sobre el aprendizaje, se inyectaron grupos independientes de ratas con anisomicina o vehículo y treinta minutos después fueron entrenadas con 1.0 ó 5.0 mA en la tarea de EI. Se midió la retención 30 minutos después del entrenamiento (MCP). Deterioros de la MCP sugerirían un deterioro en el aprendizaje. La ausencia de deterioros en la MCP sugeriría que las deficiencias en la retención a las 48 horas (MLP) se explican mejor como una interferencia con la consolidación de la memoria. En la figura 9 se esquematiza el desarrollo temporal del tratamiento.

El diseño experimental empleado fue de grupos independientes para cada intensidad de choque, como se muestran en la tabla 5.

TABLA 5. ADMINISTRACIÓN 30 MINUTOS ANTES DEL ENTRENAMIENTO

Intensidad de choque	Relativamente bajo 1.0 mA	Relativamente alto 5.0 mA
Dosis $\mu\text{g} / 0.5 \mu\text{L}$	31.25 (n=6)	31.25 (n=6)
	Vehículo (n=6)	Vehículo (n=12)

Tabla 5. Diseño experimental de grupos independientes. Vehículo: grupos control, Anisomicina: grupos con administración de anisomicina en una dosis de 31.25 $\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$, La intensidad de choque en el entrenamiento correspondió de 1.0 y 5.0 mA. Entre paréntesis se indica el número de sujetos por grupo.

4.10 Dependencia de estado

Debido a que en el tratamiento pre-entrenamiento, los animales están bajo el efecto de la droga durante el aprendizaje, podría ocurrir una dependencia de estado, una forma característica de aprendizaje en la que la información que ha sido aprendida mientras el animal se encuentra bajo la influencia de una cierta droga (estado) puede ser evocada y utilizada para resolver una tarea sólo cuando el animal se encuentra en el mismo estado en el cual la información fue aprendida, pero no en un estado diferente, por ejemplo cuando no está bajo la influencia del fármaco. Para determinar si este es el caso, se entrenaron dos grupos independientes de animales en la tarea de EI con una intensidad de 5.0 mA. Se inyectó vehículo o anisomicina tanto 30 minutos antes del entrenamiento como 30 minutos antes de la prueba de retención a las 48 h (véase figura 9).

El diseño experimental empleado fue de grupos independientes para cada intensidad de choque, como se muestran en la tabla 6.

TABLA 6. ADMINISTRACIÓN 30 MINUTOS ANTES DEL ENTRENAMIENTO

Intensidad de choque	Relativamente alto 5.0 mA
Dosis $\mu\text{g} / 0.5 \mu\text{L}$	31.25 (n=8)
	Vehículo (n=12)

Tabla 6. Diseño experimental de grupos independientes. Vehículo: grupos control, Anisomicina: grupos con administración de anisomicina en una dosis de 31.25 $\mu\text{g}/0.5\mu\text{L}$, La intensidad de choque en el entrenamiento correspondió 5.0 mA. Entre paréntesis se indica el número de sujetos por grupo.



Tratamientos

A. Solución Vehículo o Anisomicina administradas 30 minutos antes del entrenamiento en la MCP (1.0 y 5.0 mA).

B. Solución Vehículo o Anisomicina administradas antes del entrenamiento. Dependencia de estado.

↓ Las flechas indican el momento de inyección del tratamiento.

Figura 9. Tratamientos sobre la memoria de corto plazo (MCP) y dependencia de estado.

4.11 Verificación de la colocación de cánulas

Para validar los datos conductuales, se realizó un estudio histológico para corroborar que la punta de los inyectores hubiese estado en la corteza insular. Finalizado cada experimento las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital y perfundidas a través de la aorta ascendente con solución salina isotónica (NaCl 0.9%) seguida de formaldehído al 10%. Una vez terminada la perfusión, los cerebros fueron removidos y fijados en una solución de formaldehído al 10%. Posteriormente se realizaron cortes coronales de 50 µm de espesor, los cuales fueron teñidos con la técnica de Nissl (véase figura 10). Los cortes se observaron bajo un microscopio de luz. Los datos de los animales en los que las puntas de las cánulas hubiesen estado fuera de la zona de interés (corteza insular) fueron descartados del análisis estadístico (véase figura 11).

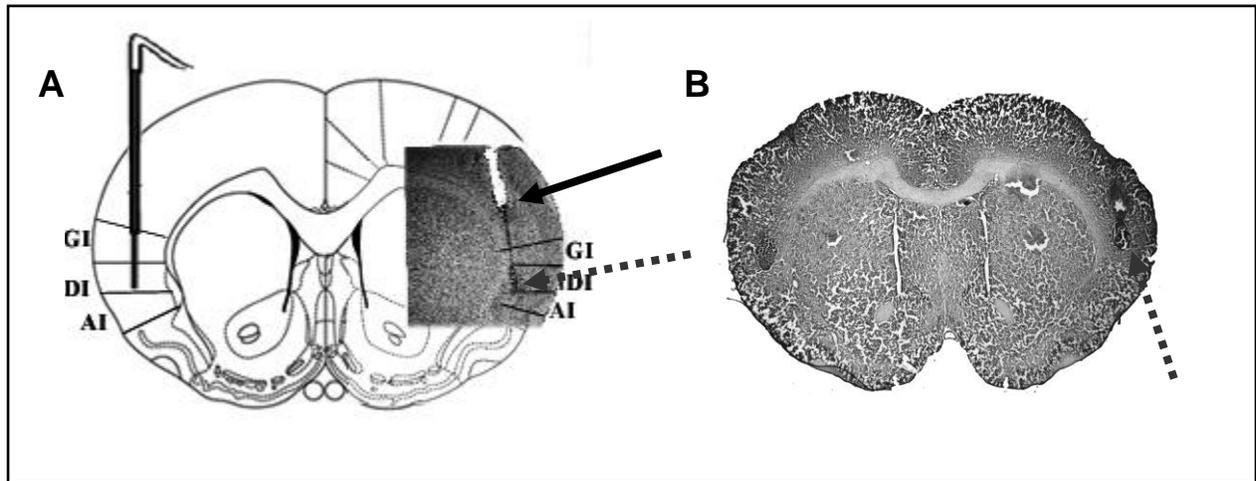


Figura 10. Sitio de administración de fármacos en corteza insular. **A.** La imagen muestra la trayectoria de la guía cánula y del inyector dispuesto entre la región disgranular (DI) y agranular (AI). GI= región granular. La punta de la flecha continua representa la localización de la punta de la cánula; la flecha discontinua representa la localización de la punta del inyector. El esquema del cerebro fue tomado del atlas estereotáxico del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998).

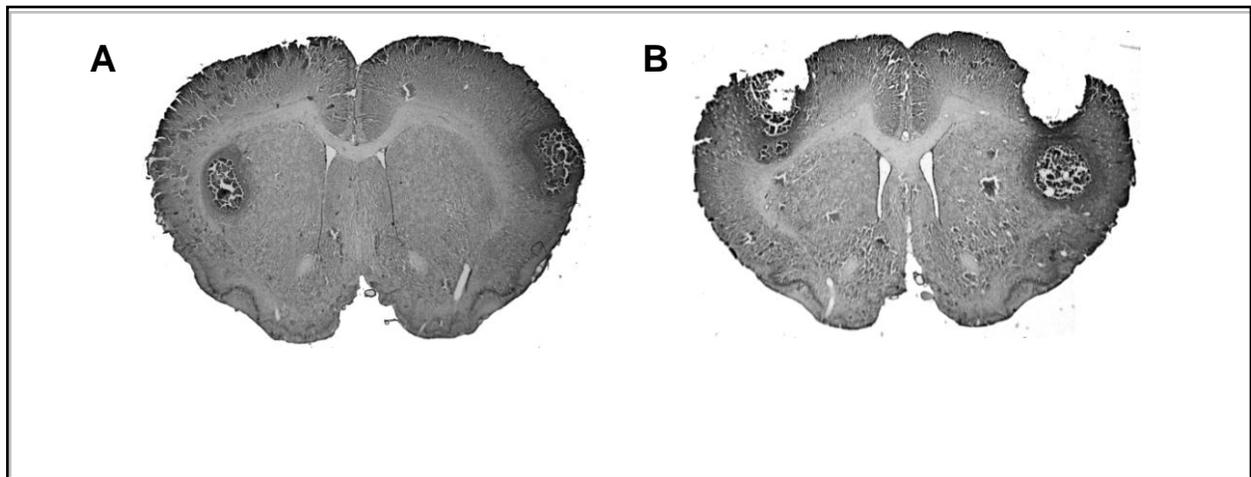


Figura 11. Ejemplos de cortes histológicos que fueron rechazados debido a que presentan: A) inyector situado en el núcleo caudado-putamen. B) Inyectores situados en el cuerpo calloso y parte de la corteza somatosensorial primaria. Además, en estos y en algunos otros casos, los cerebros rechazados presentaron un amplia distorsión producida por reacciones gliales o por procesos aparentemente infecciosos.

4.12 Análisis estadístico

Debido al punto de corte arbitrario de 600 segundos, los datos derivados de las latencias de retención no se distribuyeron de forma normal. Por esta razón se utilizó un análisis estadístico de tipo no paramétrico. Cuando las comparaciones fueron entre más de dos grupos, el análisis de los datos de las latencias de adquisición, escape y retención se efectuó, en forma independiente, con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Se utilizó la prueba *post-hoc* U de Mann Whitney para determinar si existen diferencias significativas entre cada par de grupos independientes.

5. RESULTADOS.

5.1 Efecto de los tratamientos administrados inmediatamente después del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

En este paradigma de EI se evaluó la MLP a las 48 horas después del entrenamiento. Las latencias de retención bajas indican que hubo amnesia o no hubo consolidación de la memoria mientras que las latencias altas indican que hubo memoria. Los resultados obtenidos se presentan en conjunto, graficando las medianas de las latencias de entradas, escape y retención.

La figura 12A muestra las latencias de entrada (latencias de adquisición) en el día del entrenamiento. Una prueba de *post- hoc* U de Mann Whitney reveló que:

- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 1.0 mA (U = 22, NS).
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 3.0 mA (U = 21, NS).
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidades de 5.0 mA (U = 18, NS).

En la figura 12B se muestra las latencias de escape en el día del entrenamiento Una prueba de *post- hoc* U de Mann Whitney reveló que:

- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 1.0 mA (U = 18, NS).
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 3.0 mA (U = 15, NS).

- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidades de 5.0 mA ($U = 14.5$, NS).

Administración inmediatamente después del entrenamiento

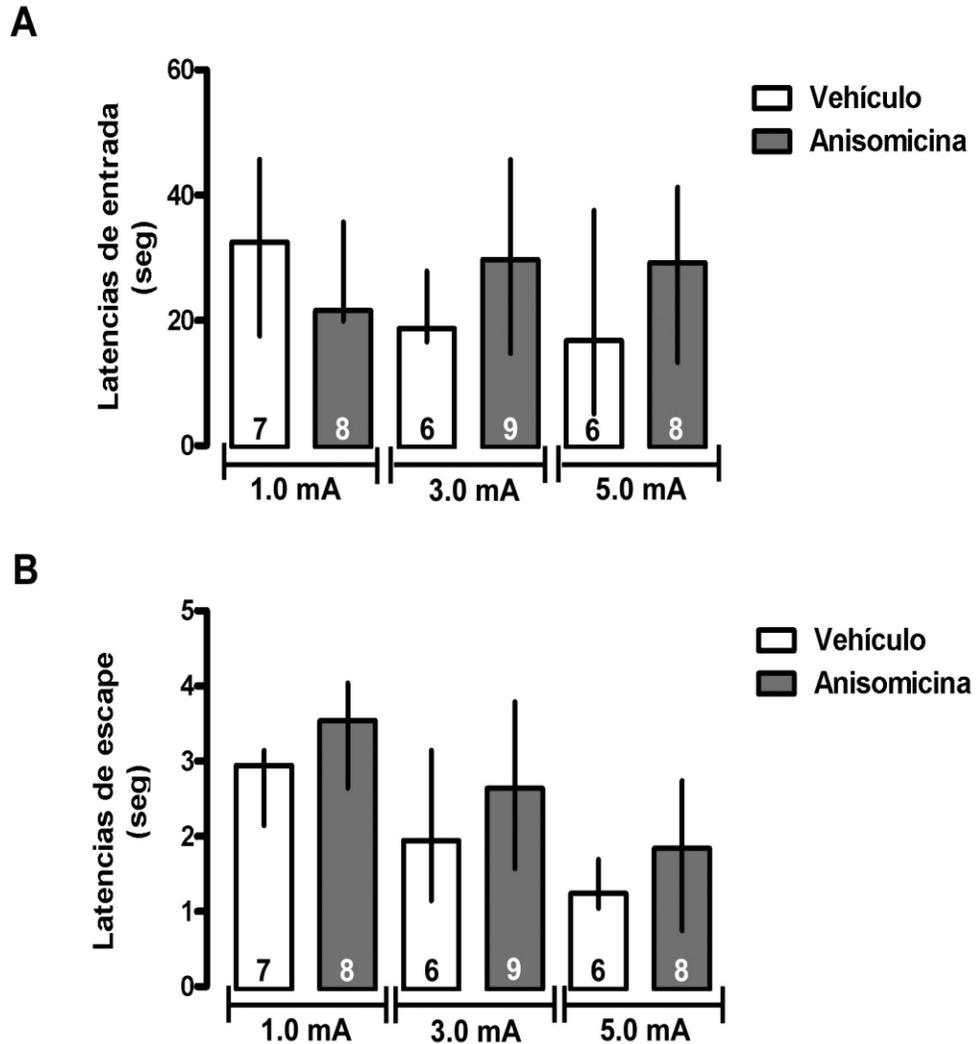


Figura 12. A. Se muestra medianas y rangos intercuartiles de las latencias de entrada de grupos animales que recibieron inyecciones de anisomicina o solución vehículo inmediatamente después del entrenamiento.

B. Se muestra medianas y rangos intercuartiles de las latencias de escape obtenidas de grupos animales que recibieron inyecciones de anisomicina o solución vehículo inmediatamente después del entrenamiento. En cada ejemplo se indica en el eje de las abscisas, las intensidades de choque utilizadas en cada grupo.

La figura 13 indica las latencias de retención de los grupos inyectados en la CI inmediatamente después de la sesión de entrenamiento. La prueba Kruskal Wallis para el análisis de varianza de grupos indica diferencias significativas entre los grupos ($H[6]= 11.46, p < 0.05$). El análisis de la *post- hoc* U de Mann Whitney reveló que:

- Existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 1.0 mA ($U = 8, p = 0.0144$).
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 3.0 mA ($U = 15, NS$).
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidades de 5.0mA ($U = 16, NS$)

Administración inmediatamente después del entrenamiento

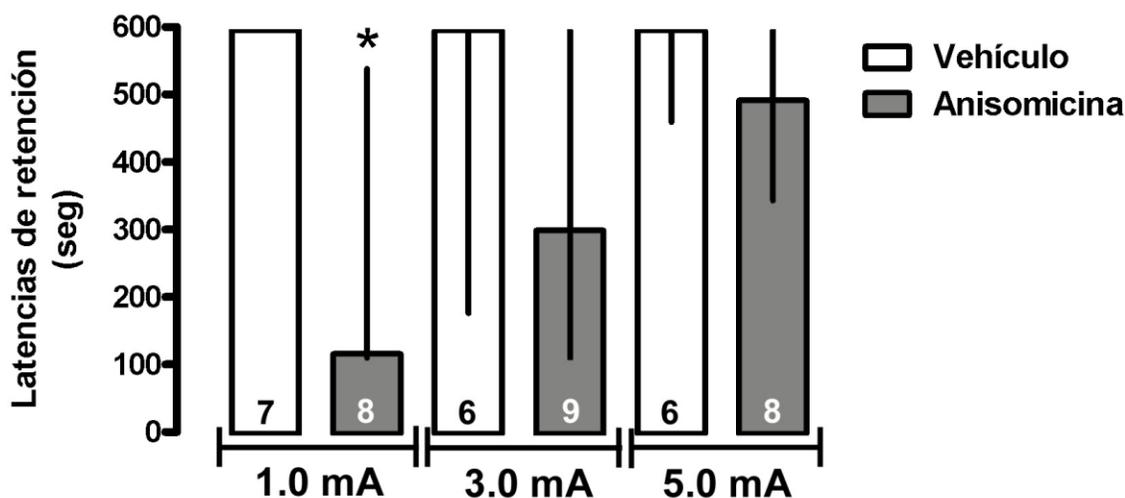


Figura 13. Se muestran las medianas y rangos intercuartilares de las latencias de retención de grupos animales tratados con anisomicina o solución vehículo inmediatamente después del entrenamiento. En el eje de las abscisas se indican las intensidades de choque utilizadas en cada grupo de animales, mientras en el eje de las ordenas se encuentra el tiempo de paso del compartimento de seguridad al de castigo (latencias de retención). *, $p < 0.05$.

5.2 Tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

En la figura 14A se muestran las latencias de entradas de grupos que se le administró solución vehículo o anisomicina 30 minutos previos al entrenamiento. El análisis con la prueba la *post-hoc* U de Mann Whitney reveló que:

- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 1.0 mA (U = 21, NS)
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidades de 5.0 mA (U = 18, NS)

En la figura 14B se indica las latencias de escape de los grupos a los que se les administró solución vehículo o anisomicina 30 minutos previos al entrenamiento. El análisis de la prueba la *post-hoc* U de Mann Whitney revela que:

- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 1.0 mA (U = 21, NS).
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidades de 5.0 mA (U = 18.5, NS)

En la figura 15 se muestra latencias de retención de los grupos a los que se les administró solución vehículo o anisomicina 30 minutos previos al entrenamiento. La prueba Kruskal Wallis para el análisis de varianza de grupos indica diferencias significativas entre los grupos (H[4]= 16.4, $p < 0.05$). El análisis de la prueba la *post-hoc* U de Mann Whitney reveló que:

- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con la intensidad de 1.0 mA (U = 18.5, NS).
- Existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con la intensidad de 5.0 mA (U = 0, $p = 0.0030$)

Administración 30 minutos antes del entrenamiento

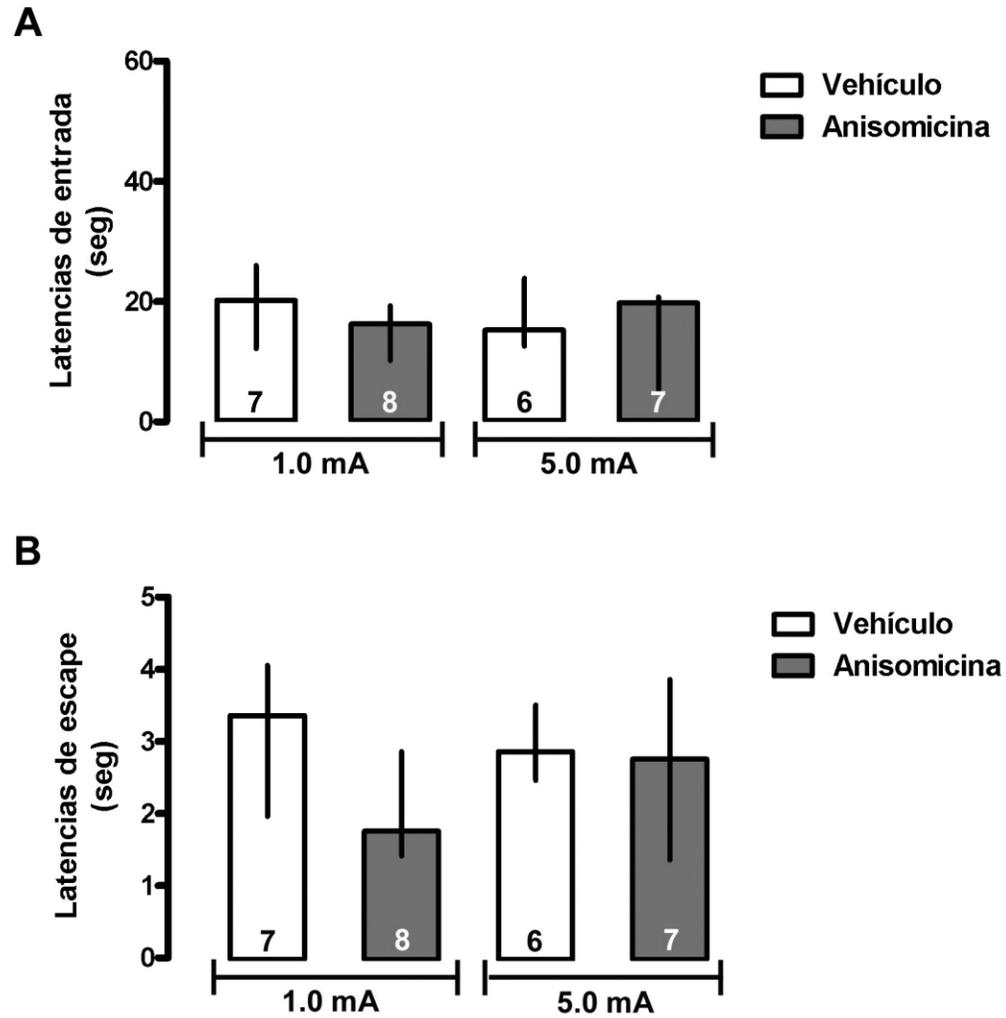


Figura 14. A. Se muestra medianas y rangos intercuartiles de las latencias de entrada de grupos animales que recibieron inyecciones de anisomicina o solución vehículo 30 minutos antes del entrenamiento del entrenamiento. B. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de escape obtenidas de grupos animales que recibieron inyecciones de anisomicina o solución vehículo 30 minutos antes del entrenamiento del entrenamiento. En cada ejemplo se indica en el eje de las abscisas, las intensidades de choque utilizadas en cada grupo.

Administración 30 minutos antes del entrenamiento

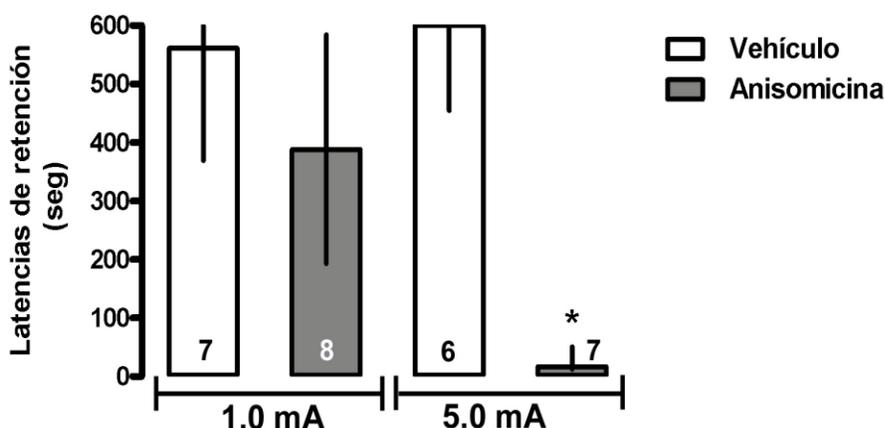


Figura 15. Se muestran las medianas y rangos intercuartilares de las latencias de retención, medidas a las 48 horas, de los grupos de animales tratados, 30 minutos antes del entrenamiento, con anisomicina o solución vehículo. En el eje de las abscisas se indican las intensidades de choque utilizadas en cada grupo, mientras en el eje de las ordenadas se encuentra el tiempo que tardaron de atravesar del compartimento de seguridad al de castigo expresados en segundos. *, $p < 0.05$.

5.3 Tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de corto plazo.

En la figura 16A se muestran las latencias de adquisición de los grupos a los que se les administró solución vehículo o anisomicina 30 minutos previos al entrenamiento: El análisis de la prueba la *post-hoc* U de Mann Whitney reveló que:

- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidad de 1.0 mA ($U = 11$, NS).
- No existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con intensidades de 5.0 mA ($U = 15$, NS)

El análisis de la prueba la *post-hoc* U de Mann Whitney reveló que en los grupos que se les administró solución vehículo o anisomicina no existe diferencias significativas en las latencias de escape entre los grupos entrenados con una intensidad de 1.0 mA ($U = 12.5$, NS) ni en los grupos entrenados con la intensidad de 5.0 mA ($U = 16$, NS) (véase figura 16B).

Administración 30 minutos antes del entrenamiento

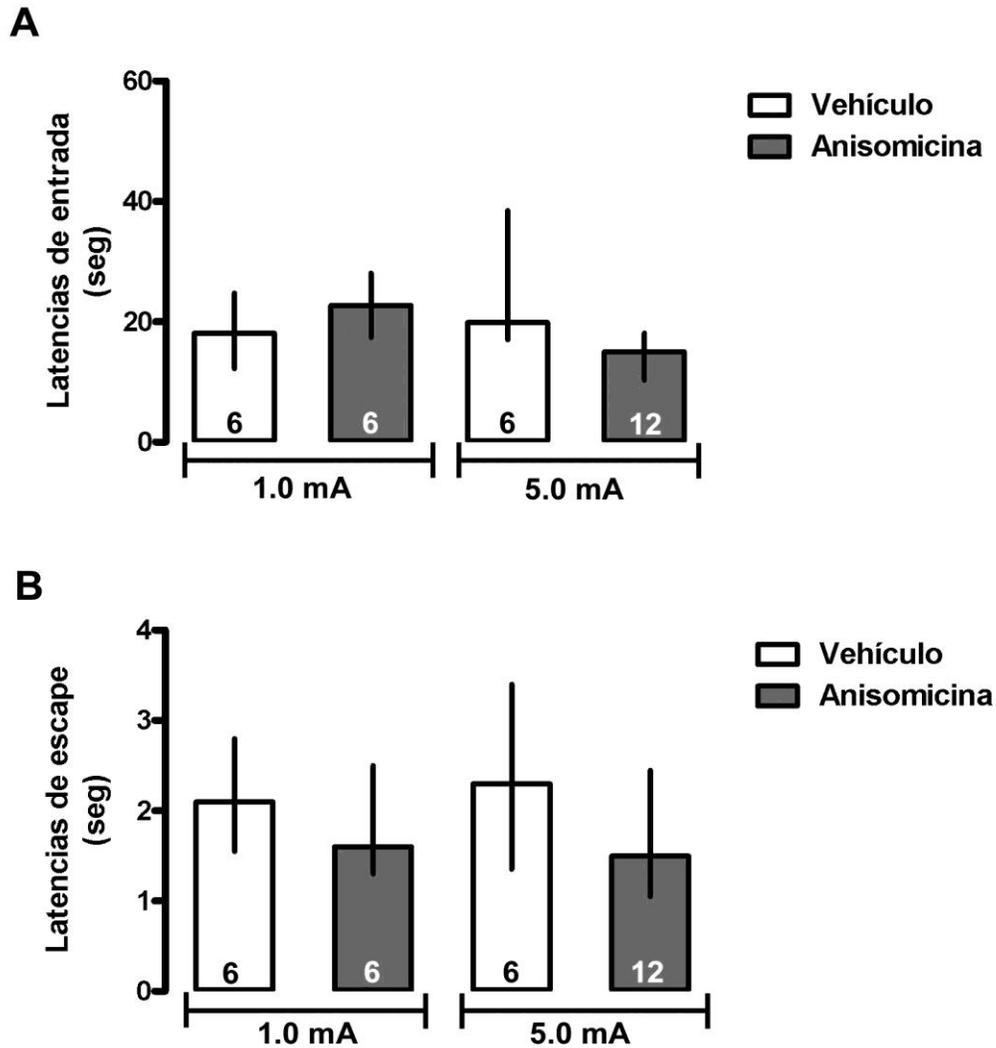


Figura 16. A. Se muestra medianas y rangos intercuartiles de las latencias de entrada de grupos animales que recibieron inyecciones de anisomicina o solución vehículo 30 minutos antes del entrenamiento del entrenamiento. B. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de escape obtenidas de grupos animales que recibieron inyecciones de anisomicina o solución vehículo 30 minutos antes del entrenamiento del entrenamiento. En cada ejemplo se indica en el eje de las abscisas, las intensidades de choque utilizadas en cada grupo.

Los datos muestran que no hubo diferencias significativas en la prueba de MCP realizada a los 30 después del entrenamiento entre los grupos de animales que recibieron inyecciones de vehículo o anisomicina, entrenados con una intensidad de choque de 1.0 mA ($U = 15$, NS) o con 5.0 mA ($U = 12$, NS) (figura 17A).

Con respecto a las latencias de retención medidas a las 48 horas, el análisis con la prueba *post-hoc* U de Mann Whitney reveló que los mismos grupos entrenados con la intensidad de 1.0 mA no presentan diferencias significativas ($U = 10$, NS), mientras que existen diferencias significativas entre los grupos entrenados con la intensidad de 5.0 mA ($U = 12$, $p = 0.0274$) (la figura 17B).

Administración 30 minutos antes del entrenamiento

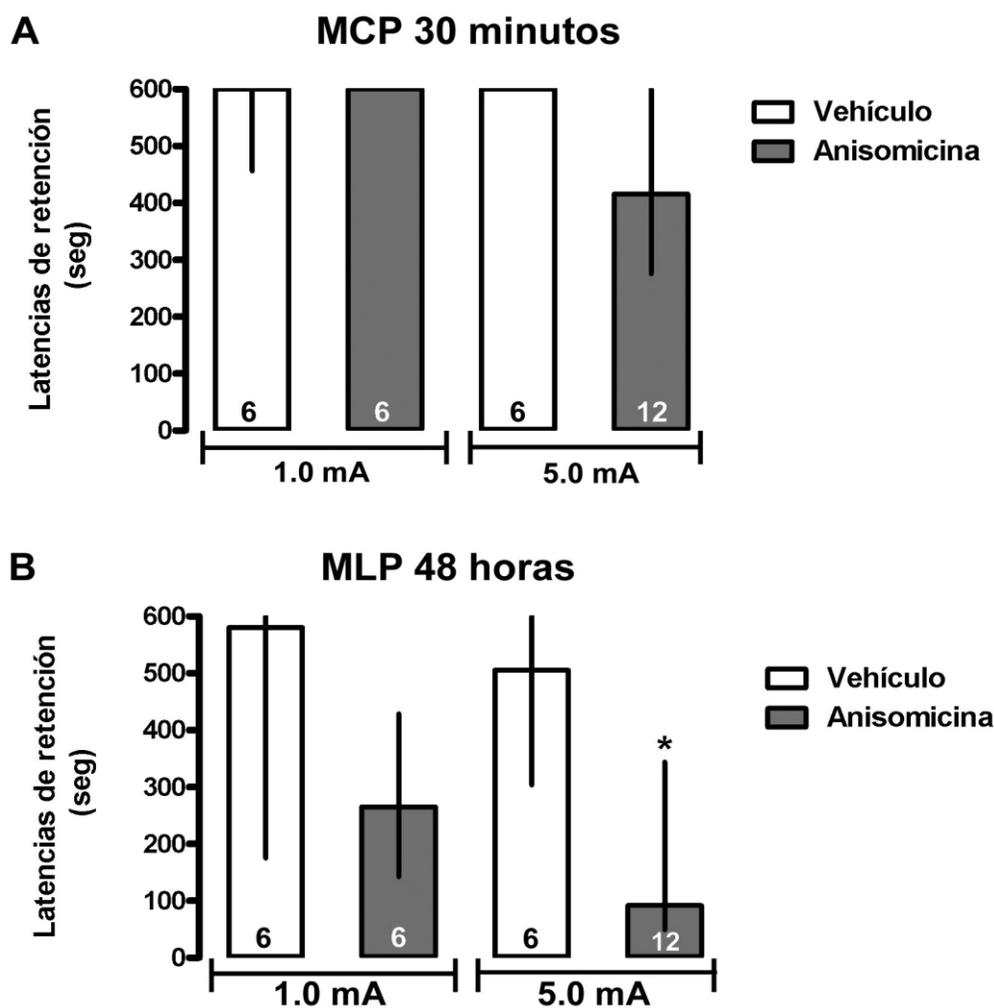


Figura 17. A. Se muestra medianas y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas 30 minutos después del entrenamiento en la tarea de EI de las ratas que recibieron inyecciones de vehículo o anisomicina 30 minutos antes del entrenamiento y entrenadas con intensidades de choque 1.0 ó 5.0 mA. B. Se muestra medianas y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas por los mismos sujetos, 48 horas después del entrenamiento. *, $p < 0.05$.

5.4 Dependencia de estado

No se encontró dependencia de estado, es decir, la forma de aprendizaje en la que la información que ha sido aprendida mientras el animal se encuentra bajo la influencia de cierta droga (estado) puede ser recordada solo cuando el animal se encuentra en el mismo estado en el cual la información fue aprendida. La administración de anisomicina antes de ambas sesiones, 30 minutos antes del entrenamiento y 30 minutos antes de la prueba de retención no revierte el deterioro en la retención de la memoria causados por la administración de anisomicina 30 minutos antes del entrenamiento ($U = 21$, $p = 0.0406$) (véase figura. 18).

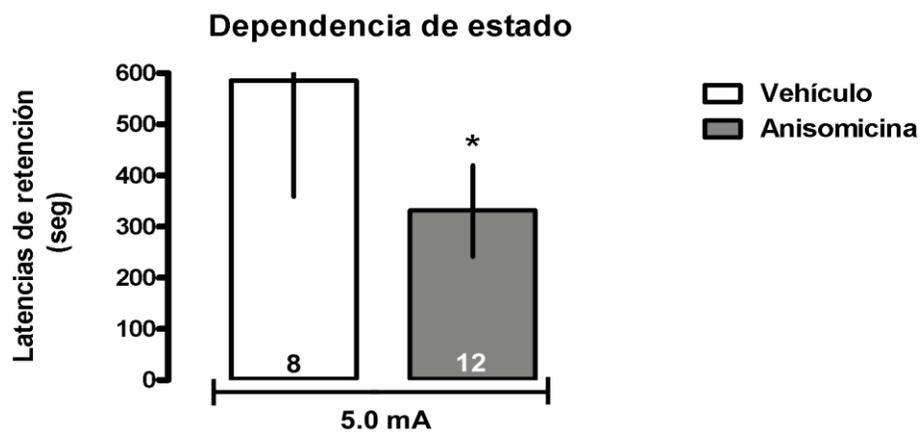


Figura 18. Se muestra mediana y rangos intercuantiles de las latencias de retención obtenidas 48 horas después del entrenamiento en la tarea de EI de las ratas que recibieron inyecciones de vehículo o anisomicina entrenadas con intensidad de choque 5.0 mA. Las inyecciones fueron administradas 30 minutos antes del entrenamiento. *, $p < 0.05$.

6. DISCUSIÓN

6.1 La anisomicina administrada posterior al entrenamiento no daña la memoria de largo plazo en condiciones de aprendizaje incrementado

El deterioro de la consolidación de la memoria inducida típicamente por el bloqueo reversible de los receptores membranales a neurotransmisores, podría deberse, indirectamente, a interrupción de la síntesis de proteínas, ya que la inactivación de dichos receptores podría impedir la expresión de genes nucleares que eventualmente se traducirían en la síntesis de proteínas. Esta posibilidad es congruente con la idea predominante de que la consolidación de la memoria es dependiente de la síntesis de proteínas. Sin embargo, experimentos recientes han demostrado que el proceso de consolidación se lleva a cabo a pesar de la administración de ISPs, en animales sometidos a aprendizajes incrementados (sobrerreforzamiento). Este hecho nos llevó a proponer la hipótesis de que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas a animales sometidos a un aprendizaje incrementado no impediría la consolidación. En el presente estudio se encontró que al administrar la anisomicina después del entrenamiento en la tarea de EI causa un notorio deterioro en la MLP cuando se realiza con choques eléctricos de menor intensidad. Sin embargo, dando apoyo a nuestra hipótesis, dicho deterioro no se presenta cuando se incrementa la intensidad del choque (figura 13). La ausencia de deficiencias, que se observan como una mayor cantidad de tiempo requerida para cruzar al compartimento de castigo no puede ser explicada por deterioros motores debido a que no se encontró diferencias significativas en las latencias de entrada y de escape (figura 12 A y B).

Se cuenta con una gran cantidad de trabajos que indican que la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas produce un déficit en el mantenimiento de la información: Por ejemplo, la administración de estos inhibidores, como la puomicina, cicloheximida o anisomicina, afectan la MLP sin alterar la MCP en tareas como el laberinto con forma de Y en ratones (Flexner *et al.*, 1963; Barondes y Cohen, 1967), aprendizaje de aversión en ratas (Roseblum *et al.*, 1993), memoria de reconocimiento de objetos (Balderas *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009) y EI en ratas (Quevedo *et al.*, 1999; Vianna *et al.*, 2006). Inclusive recientemente se evaluó que el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos al midazolam sobre la actividad

exploratoria de ratas en el laberinto elevado en cruz (LEC²) puede verse afectada por la administración de los ISPs, esto debido a que se ha observado que los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas pueden desarrollar una memoria relacionada a una experiencia previa de aprendizaje (Gazarini *et al.*, 2011). Los efectos del midazolam se deben a su acción sobre los receptores GABA_A. Este fármaco no activa los receptores directamente, sino que al igual que con otras benzodiazepinas, se potencia el efecto del neurotransmisor GABA en los receptores. Se considera al midazolam como una benzodiazepina de acción corta que desarrolla más rápidamente tolerancia. Los autores sugieren que existen dos circunstancias en las cuales el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos pierde su acción. 1) Cuando la tolerancia tiende a desaparecer con el paso del tiempo, después de que el uso del fármaco es discontinuado (tolerancia farmacológica). 2) Cuando los efectos ansiolíticos desaparecen, si los animales son expuestos previamente a diferentes modelos para medir ansiedad. Los resultados de este trabajo, muestran que la infusión de anisomicina en el hipocampo dorsal, inmediatamente o hasta 6 horas después la exposición al LEC, preserva el efecto ansiolítico del midazolam en una segunda exposición en la tarea (prueba de la MLP), realizada a las 24 horas, a diferencia de los grupos controles que mostraron mayor exploración en cada uno de los brazos del laberinto (Gazarini *et al.* 2011). En este sentido, el deterioro en la MLP en los distintos paradigmas, sólo puede observarse en la memoria de aprendizajes mediados por estímulos relativamente débiles, o establecidos a través de un número relativamente bajo de ensayos o de sesiones de entrenamiento (Prado-Alcalá *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en la figura 13 apoyan la hipótesis del efecto protector inducido por el incremento en la experiencia de aprendizaje en contra tratamientos amnésicos. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que el aprendizaje incrementado impide los efectos amnésicos de la administración sistémica de escopolamina, que bloquea los receptores muscarínicos de acetilcolina (Cruz-Morales *et al.*, 1992; Duran-Arévalo *et al.*, 1990) y de p-cloroanfetamina, que lesiona las vías serotoninérgicas cerebrales (Solana-Figueroa *et al.*, 2002). Esto sucede también con tratamientos que usualmente producen amnesia cuando son

² Este modelo evalúa la exploración de la rata en un nuevo ambiente que presenta dos zonas diferentes: Una potencialmente aversiva (brazos abiertos) y otra segura (brazos cerrados). En su estado natural la rata elige estar cerca de superficies verticales, preferiblemente rincones y lugares con poca iluminación, los campos abiertos y las alturas le causan aversión, lo que explica porque la rata permanezca más en los brazos cerrados que los brazos abiertos (Korte y De Boer, 2003).

aplicados en el hipocampo dorsal (Quiroz *et al.*, 2003), sustancia nigra (Cobos-Zapiain *et al.*, 1996) y el estriado (Prado-Alcalá *et al.*, 2007).

En congruencia con los resultados reportados en esta tesis, recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la administración subcutánea de cicloheximida, que al ser administrada sistémicamente inmediatamente después del entrenamiento incrementado, impide el efecto amnésico de esta droga (Díaz-Trujillo *et al.*, 2009). Posteriormente se cuantificó el grado de inhibición de síntesis de proteínas a través de la incorporación de L-[³⁵S] metionina radiactiva. El grupo de animales entrenado en la tarea de EI, obtuvo un porcentaje de inhibición de síntesis de proteínas del 64 % a los 30 minutos posterior al sacrificio, al igual que un grupo control que no fue entrenado, sugiriéndose que el entrenamiento incrementado no reduce el grado de inhibición de síntesis de proteínas. Otros investigadores han reportado que la administración de cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas en la mayor parte de los momentos en la administración del inhibidor produce amnesia de la tarea de EI; es decir, alrededor del momento del entrenamiento y a las 3-6 h post-entrenamiento (Freeman *et al.*, 1995; Quevedo *et al.*, 1999). De la misma forma, hemos demostrado que la administración de anisomicina en el hipocampo dorsal, 15 minutos antes del entrenamiento con intensidades mayores de choques eléctricos no produce deterioro en la MLP (Rodríguez-Serrano, 2010). A pesar de esto, no se ha determinado el grado de inhibición de síntesis de proteínas a través del tiempo en condiciones de aprendizaje incrementado, para el caso de la administración de anisomicina en el hipocampo o en la corteza insular.

En algunos estudios se han empleado dosis de 120 µg/1 µL de anisomicina en la CI, lo cual produce una inhibición alrededor del 95% y es mantenida hasta 4 horas, ocasionando deterioro en la memoria de la tarea de aversión a los sabores en ratas (Moguel-Gonzalez *et al.*, 2008; Rosenblum *et al.*, 1993) y de reconocimiento de objetos en ratas (Balderas *et al.*, 2008). El trabajo de Quevedo *et al.* (1999) sugiere que la síntesis de proteínas tiene dos periodos, alrededor del momento en que la administración de anisomicina afecta la consolidación de la memoria. Si el fármaco es inyectado en el hipocampo dorsal, 15 minutos antes o 3 horas después del entrenamiento, se presenta un efecto amnésico en una variante de la tarea de EI

conocida como descenso de escalón (step-down)³. Lo anterior permite sugerir que existe un margen muy pequeño para considerar que la síntesis de proteínas remanente permita el almacenamiento de la información. Una posibilidad, es que la síntesis de proteínas sea necesaria para la formación de la MLP, y que esta síntesis se demora hasta el momento en que el efecto del fármaco decae, lo cual no excluye la primera posibilidad en los casos en los que la inhibición no es completa. La evidencia a favor de esta segunda interpretación, es que dosis repetidas que prolongan la inhibición sea capaz de bloquear el efecto protector contra la amnesia ejercida por el aprendizaje incrementado (Flood *et al.*, 1973; Flood *et al.*, 1975). Sin embargo, ninguna de estas interpretaciones es consistente con la evidencia de que la amnesia producida puede revertirse farmacológicamente.

6.2 La anisomicina administrada antes del entrenamiento produce deterioro en la memoria de largo plazo en condiciones de aprendizaje incrementado.

Es relevante mencionar que cuando se inyectó la anisomicina antes del entrenamiento, en la corteza insular se dañó la consolidación de la tarea de EI. Los animales sometidos tanto a un bajo y como a un alto nivel de aprendizaje presentaron el deterioro en la MLP en el día de la prueba (figura 15). Este efecto inesperado en el deterioro de la MLP en el grupo de animales con aprendizaje incrementado (sobrerreforzamiento), no había sido encontrado en otros trabajos realizados por nuestro grupo de investigación.

Los resultados obtenidos concuerdan con los datos obtenidos por Squire y Barondes en el 1974. En este estudio, se entrenaron ratones en una tarea de discriminación automatizada denominada Carrusel Deutsch⁴ (Deutsch Carousel, del inglés). Los animales que recibieron un mayor número de ensayos (27 ensayos) y que se les aplicó de manera sistémica los inhibidores

³ En dicho procedimiento se utiliza una caja rectangular con suelo electrificado, la cual tiene una plataforma elevada en el centro. Se coloca un cilindro para cubrir al animal. En el momento que, el roedor es colocado en la plataforma, su tendencia espontánea es descender al suelo casi inmediatamente para explorar el espacio y aproximarse a las paredes de la caja. El animal al descender recibe una descarga eléctrica en las patas. La retención se evalúa colocando de nuevo al animal en la plataforma (día de prueba) y midiendo el tiempo que tarda en saltar de nuevo al suelo. El cilindro se utiliza para evitar la tendencia innata del animal a escapar de la mano humana al dejarlo sobre la plataforma, colocado directamente con la mano (Izquierdo *et al.*, 1999).

⁴ Este aparato estaba compuesto de una plataforma giratoria de forma circular controlada por una computadora, en cuyo perímetro, se encuentran ubicados 3 estaciones y en cada una se encontraban dos objetos de acero. Los animales fueron colocados en el centro de la plataforma y sujetos de la cola, con su mirada dirigida hacia el exterior. En el día del entrenamiento, durante cada ensayo, los ratones se les hicieron girar alrededor de las estaciones y estos debían tocar el objeto de menor tamaño que les permitiría escapar de una descarga eléctrica en las patas. Se consideró como un ensayo correcto cuando los animales tocaron el objeto de menor tamaño antes de tocar el de mayor tamaño (Squire y Barondes, 1974).

de la síntesis de proteínas (anisomicina), (cicloheximida) o la solución vehículo, treinta minutos antes de la sesión de entrenamiento, se observó un claro deterioro en la memoria en días posteriores. De manera similar los animales que recibieron un menor número de ensayos (21 ensayos) presentaron interrupción en la memoria cuando el tratamiento fue aplicado antes del entrenamiento (Squire y Barondes, 1974). Esto contrariamente a lo que otros estudios realizados por Flood y colaboradores, que habían demostrado que las administraciones sistémicas de dosis amnésicas de anisomicina o cicloheximida antes del entrenamiento la tarea de EI Step-through, (misma variante que ha sido utilizada en el presente trabajo), no producen amnesia cuando los animales son entrenados con intensidades de choque relativamente altas (Flood *et al.*, 1972; Flood *et al.*, 1973).

Sin embargo, generalmente en los estudios de memoria, los tratamientos pre-entrenamiento no permiten interpretaciones claras de los resultados conductuales, debido a que las deficiencias en la ejecución de las tareas podrían no ser causadas por interferencias con procesos mnemónicos. En algunos casos los efectos pueden ser originados por interferencias con variables motoras, perceptuales o motivacionales. Además, las mismas variables podrían estar siendo influenciadas por el aprendizaje incrementado. En cambio, la administración del tratamiento inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de EI nos permite descartar la participación de estas variables en el efecto protector contra la amnesia producida por la anisomicina. En el presente estudio, la anisomicina no produjo deficiencias significativas en la memoria de corto plazo (figura 17). La ausencia de deficiencias, que se observan como una mayor cantidad de tiempo requerida para cruzar al compartimento de castigo no puede ser explicada por deterioros motores debido a que no se encontró diferencias significativas en las latencias de escape (figura 16B).

Los resultados obtenidos en el experimento de dependencia de estado, nos muestran que cuando se administró anisomicina antes del entrenamiento y de la prueba, no se presentó un aprendizaje dependiente de estado, ya que se observa nuevamente el efecto amnésico del inhibidor de la síntesis de proteínas en la corteza insular (figura 18). A favor de esta conclusión se encuentra un estudio realizado por Patterson y colaboradores (1989), quienes demostraron

que administraciones de anisomicina en la región IMHV⁵, son capaces de producir de amnesia en pollos entrenados en una variante la tarea de EI, sin que exista un efecto de dependencia de estado. Además, es consistente con otros estudios previos, el efecto amnésico de la anisomicina cuando se administró previo al entrenamiento en otras regiones cerebrales como la amígdala y el hipocampo (Canal *et al.*, 2007; Quevedo *et al.*, 1999; Rodríguez-Serrano, 2010).

Como se ha mencionado en líneas anteriores, con los tratamientos que son aplicados después del entrenamiento incrementado mediado por estimulación aversiva, no se produce el deterioro en la MLP independientemente del agente amnésico usado y su modo de administración. Esto puede ser argumentado, de que algunos fármacos como es el caso de la anisomicina, no producen amnesia después aprendizaje incrementado, debido a que se aceleró y se estableció la consolidación de la memoria, y el efecto máximo de la anisomicina no ocurre después de que la consolidación ha tomado lugar (Salado-Castillo *et al.*, 2011). Algunos reportes sugieren que este establecimiento aparece en menos de 5 minutos, entre el intervalo de la formación de la memoria y la aplicación de los tratamientos amnésicos (Quirarte *et al.*, 1994). Los resultados indican que este argumento al parecer es correcto, y la región de la CI se lleve acabo una aceleración de almacenamiento de la memoria.

Experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo han explorado en las regiones cerebrales que participan en la consolidación de la memoria de la tarea EI, la posibilidad de inducir deterioro en la MLP en animales que hayan recibido un sobrerreforzamiento. Sin embargo, hasta el momento los resultados habían sido nulos. Por ejemplo, se aplicó un bloqueador de las corrientes de Na²⁺ (tetrodotoxina, TTX) en el hipocampo dorsal 30 minutos antes del entrenamiento con intensidades relativamente altas y no se presentó deterioro en las latencias de retención en el día de la prueba a las 48 horas, habiéndose descartando la posibilidad de un efecto de aprendizaje ligado a estado (Garín-Aguilar *et al.*, 2003). Con respecto a la administración de la anisomicina en la CI, 30 minutos antes del entrenamiento, permite que se alcance una inhibición proteínica máxima al momento del entrenamiento, lo cual produjo amnesia en el día de la prueba. De acuerdo con lo anterior, la intensidad de choque

⁵ Siglas del inglés. (Intermediate medial hyperstriatum ventrale) La parte intermedia del hiperestriado ventral medial es un área del cerebro de los pollos considerada como el análogo al cuerpo estriado de mamífero, que ha demostrado ser importante para el aprendizaje de varias tareas, y en la que se han detectado eventos moleculares importantes relacionados con eventos plásticos sináptica, tales como actividad glutamatérgica aumentada como consecuencia del aprendizaje, activación de receptores NMDA, entrada masiva de Ca²⁺ en la postsinapsis, activación de cinasas (Rose, 2000).

incrementado es uno de los factores que desencadena los mecanismos que permitan evidenciar la participación en paralelo de varias estructuras en la memoria de la tarea de evitación inhibitoria. El número de estructuras comprometidas en condiciones de entrenamiento con bajo choque es menor, pero conforme se incrementa la intensidad de choque, otras estructuras se van integrando o comprometiendo con el procesamiento (Quiroz *et al.*, 2003; Prado Alcalá *et al.*, 2007).

Recientemente se demostró que la administración simultánea de lidocaína en grupos de ratas que fueron implantadas en dos estructuras (el estriado + la sustancia negra compacta, amígdala + sustancia negra compacta o amígdala + estriado) y se les sometió a condiciones de alto entrenamiento (3.0 mA), no presentaron déficit en la memoria. Estos resultados fueron similares en grupos de ratas a las cuales solo les implanto en una región (Salado-Castillo *et al.*, 2011). Este hallazgo permite sugerir que el aprendizaje incrementado (sobrerreforzamiento) activa la participación de otros sistemas de memoria que reciben y procesan la información de forma paralela, lo que permite explicar el fenómeno de protección a la amnesia.

Esto resulta de sumo interés ya que, por los datos obtenidos en esta tesis, se puede sugerir que durante el entrenamiento de EI un sistema de memoria compuesta por lo menos hipocampo, amígdala, estriado, sustancia negra compacta y la corteza insular estén participando en el procesamiento de información de esta tarea. De tal forma que cuando sucede alguna interferencia en una o varias de las estructuras, la información derivada de la experiencia de aprendizaje sigue su curso hacia el resto de los elementos del sistema para que se produzca la consolidación de la memoria. Aunado a lo anterior, la intensidad de choque incrementado pudiera ser uno de los factores que desencadene los mecanismos que permiten evidenciar la participación de estas regiones en paralelo y, como el caso de la CI, se acelere el almacenamiento de la información. Sin embargo, aún no se tiene claro cuales mecanismos puedan llevar a posibles cambios sinápticos.

Se puede considerar el papel del estrés en el deterioro de la MLP en condiciones de aprendizaje incrementado (sobrerreforzamiento), que presupone un mayor nivel de estrés que en los entrenamientos con intensidades de choque más bajas. Es bien conocido que las hormonas liberadas durante situaciones de estrés tienen un efecto modulador de la memoria, y bajo determinadas condiciones producen mejoramiento o deterioro de la misma (McGaugh y Roozendaal, 2002). Estudios realizados por McGaugh y colaboradores desde la década de los

sesentas, sugieren la existencia de un mejoramiento o facilitación de la consolidación de la memoria. Ellos describieron que la administración sistémica de estimulantes del SNC facilitan el proceso de consolidación en distintas tareas de aprendizaje (McGaugh y Roozendaal, 2009). Un ejemplo de estos trabajos reportan que la administración por vía intraperitoneal de sulfato de estriquina administrada inmediatamente o 15 minutos después de cada ensayo de entrenamiento en la resolución de un laberinto T se produce una mejoría de la consolidación de la memoria en esta tarea (McGaugh *et al.*, 1962).

Cabe mencionar que todas las experiencias de aprendizaje producen estrés en diferentes grados, entre otras causas debido a que implican por lo general situaciones de novedad, incluso cuando se usan reforzadores positivos. En el caso de las ratas, es bien conocido que son por naturaleza neofóbicas, por lo que resulta complicado aislar las respuestas de estrés *per se*, de otros aspectos importantes en la formación de la memoria, de los eventos celulares y moleculares que se encuentran asociados con la formación de la memoria, y de las interacciones entre estos factores. Sin embargo, resulta evidente que la intensidad del choque eléctrico podría dar diferentes respuestas de estrés al menos de forma cuantitativa, aunque hasta el momento no se ha determinado el grado de participación del estrés en el efecto protector contra la amnesia producida por anisomicina. Existe evidencia de que un choque eléctrico de intensidad baja (0.55 mA) aplicado en ratas incrementó los niveles de noradrenalina en la amígdala medido a través de microdiálisis (Galvez *et al.*, 1996). Mientras que la cantidad de esta catecolamina liberada varió directamente con la intensidad del choque eléctrico (0.3, 0.7 y 1.2 mA) (Quirarte *et al.*, 1998).

Por otra parte, la administración post-entrenamiento de hormonas adrenocorticales facilitan el proceso de consolidación de la memoria de tareas dependientes de contexto. La administración subcutánea de corticosterona después del entrenamiento de la tarea de condicionamiento de miedo al contexto mejoró la memoria, cuando se realizó la prueba a las 24 horas (Hui *et al.*, 2004). La administración de un antagonista de receptores β_1 adrenérgicos inmediatamente después de la tarea de EI en el núcleo de la amígdala basolateral (ABL), bloquea los efectos de facilitación de la memoria inducidos por la administración de un agonista de receptores a glucocorticoides tipo II en la misma región (Quirarte *et al.*, 1997). Otro estudio ha demostrado que la administración de corticosterona en la región del estriado dorsal de ratas, inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de EI, produce efectos dependientes de la

dosis: Dosis moderadas (10 ng) producen mejoría en la memoria y dosis altas (60 ng) producen deterioro. En el mismo estudio se sugiere que los efectos de facilitación son bloqueados cuando se administra un antagonista de los receptores beta adrenérgicos en la ABL (Medina *et al.*, 2007).

De lo anterior se puede especular que los mecanismos de acción que participan en el fenómeno de facilitación de la consolidación de la memoria de la tarea de EI pueden deberse a la acción de este subgrupo de hormonas esteroideas denominados glucocorticoides. Algunos estudios sugieren que la fuerza que establece la información en una memoria de largo plazo podría depender del estímulo estresante en la situación de entrenamiento. En una serie de experimentos llevados a cabo en los días de prueba de la tarea de condicionamiento al miedo al contexto, en distintos grupos de ratas se sometieron a diversas intensidades de choque eléctrico (entre 0.2 y 1.0 mA), se observó una relación directa entre la intensidad del choque eléctrico en el entrenamiento y el nivel de inmovilización (respuesta condicionada de miedo utilizada como índice de memoria) observados en los días de la prueba de MLP (Cordero *et al.*, 1998). El mecanismo de acción clásico de los glucocorticoides es la modulación del proceso de transcripción con efectos inmediatos sobre la síntesis de un amplio número de proteínas lo que permitiría pensar que puede inducir cambios plásticos relacionados en memoria (McEwen, 1999). Aunque resulta evidente que la intensidad del choque eléctrico podría dar diferentes respuestas de estrés, al menos de forma cuantitativa y llevando a cabo activación de mecanismos de estrés, queda por comprobar el grado de participación del estrés en el efecto protector contra la amnesia producida por inhibición de síntesis de proteínas.

La mayor parte de la literatura sugiere que la memoria es mantenida en el sistema nervioso a través de cambios en la estructura de los contactos sinápticos de las neuronas. Esta plasticidad se inicia en respuesta a la actividad, dependiente del aprendizaje, de la postsinapsis. Esto implica que la señal inicial postsináptica, dada por los ligandos en el espacio sináptico, debe ser comunicada por otras moléculas intracelulares a los mecanismos responsables de los cambios directamente relacionados con la reestructuración de la sinapsis, entre ellos la síntesis de proteínas (Abel y Lattal, 2001)

Tomando en consideración los datos obtenidos en este trabajo, podría especularse que en condiciones de aprendizaje incrementado podría reclutarse proteínas ya existentes para la formación de la memoria a largo plazo. Algunos trabajos han sugerido que el factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), como un potente mediador debido a su capacidad reguladora de las modificaciones funcionales y morfológicas, esenciales para la consolidación sináptica (Bramham y Wells, 2007). BDNF se encuentra en vesículas presentes en los botones terminales y las dendritas de neuronas glutamatérgicas y su secreción se da en forma dependiente de actividad tanto de sitios pre como postsinápticos (Hartmann *et al.*, 2001). Además de que tiene un papel importante en la expresión de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) en el hipocampo tanto en sus fases tempranas como tardías. Se ha demostrado que la subsecuente estimulación de síntesis de proteínas es mediada por BDNF, para el mantenimiento de la LTP.

Bekinschtein y colaboradores (2007), han reportado el efecto de BDNF en la tarea de EI con la variante de step-down. Los resultados señalan que 12 horas después de la adquisición se presenta en una fase dependiente de síntesis de proteínas y BDNF para la estabilización de la memoria en el hipocampo. Y por otra parte, Moguel-Gonzalez y colaboradores (2008), reportaron que la administración de BDNF previa a la sesión de entrenamiento en la tarea de aversión a los sabores, revierte el deterioro en la MLP ocasionado por la anisomicina en la corteza insular. Sugiriendo que esta neurotrofina es indispensable en la estabilización de la memoria. De la misma forma, un estudio reciente demostró que este deterioro en la MLP para esta tarea puede presentarse en dos ventanas temporales a las 5 y 7 horas después de la adquisición. La administración de BDNF inmediatamente después de la administración de anisomicina revierte el deterioro de la memoria en ambos periodos de tiempo. Esto permite sugerir que BDNF es un producto esencial y es requerido en regiones de la neocorteza como es el caso de la corteza insular, incluso horas después de que la información ha sido consolidada (Martínez-Moreno *et al.*, 2011).

De igual forma, estudios recientes realizados por Moncada y colaboradores (2011) han sugerido que la novedad de un contexto, juega un papel importante en el establecimiento de la consolidación de la memoria. Estudios previos han demostrado que la LTP temprana puede ser robustecida en una LTP tardía debido a la exposición de ratas a ambientes novedosos. Este efecto se observó después de un periodo corto de exposición. Por lo tanto, se postuló que proteínas relacionadas a eventos plásticos, son sintetizadas (plasticity-related proteins, del inglés) en el periodo de la novedad. En este sentido, la novedad induce un reforzamiento en la LTP y es bloqueada cuando un inhibidor de la síntesis de proteínas es aplicado antes de la

exploración a un ambiente novedoso. Para explicar cómo las proteínas sintetizadas interactúan con entradas específicas, la hipótesis del etiquetamiento sináptico (synaptic tagging, del inglés) postula que proteínas relacionadas a eventos plásticos son capturadas en sinapsis específicas que fueron previamente etiquetadas por actividad sináptica. Una etiqueta sináptica marca de manera transitoria una sinapsis después de la activación en una vía en la cual el reconocimiento local de proteínas sintetizadas producen un cambio en la eficiencia de la transmisión (Ballarini *et al.*, 2009).

Los autores demostraron que un bajo entrenamiento en EI step-down, induce la formación de una MCP, pero no una MLP. Sin embargo, si los animales son sometidos a un protocolo de exploración de un campo abierto novedoso⁶, antes o después del bajo entrenamiento, la exploración a un ambiente novedoso, pero no familiar, induce la formación de una MLP, después de la sesión de entrenamiento. Este efecto causado por la novedad depende de la activación de receptores dopaminérgicos D₁ y D₅ y de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal (Moncada y Viola, 2007). A este proceso le han denominado como marcaje o etiqueta conductual (behavioral tagging, del inglés). Estos autores proponen que este proceso requiere de la síntesis de proteínas relacionadas a eventos plásticos como mecanismo general en la formación de la MLP, el cual se establece a partir de una etiqueta de nuevo o familiar en condiciones de un bajo entrenamiento que permiten la estabilización de un trazo de memoria (Moncada y Viola, 2007; Ballarini *et al.*, 2009).

Asimismo estos autores demostraron que animales a los cuales se les sometió al protocolo de exploración de un campo abierto 1 hora antes del bajo entrenamiento de EI step-down (los animales recibieron una intensidad de choque eléctrico de 0.15 mA), induce la formación de una MLP. Asimismo se observó que la administración i.p. de agonistas receptores de D₁ y D₅ (SFK 38393) y de agonistas del receptor de noradrenalina β_1 , 70 minutos antes del entrenamiento promueven la consolidación de la tarea inducida por la exposición a la novedad. Bajo estas condiciones experimentales, se observó un déficit en la memoria cuando se

⁶En dicho procedimiento, se utiliza una caja cuadrada de color negro cuyo piso es dividido en nueve cuadrantes y es cubierto con arena. En una sesión de novedad consistió en colocar al roedor en el interior permitiéndole el explorar libremente el contexto durante 5 minutos antes del entrenamiento de la tarea de EI. Por otra parte, una sesión de familiaridad, al roedor se le permite explorar libremente durante 30 minutos y este habituara al contexto, un día previo al entrenamiento (Moncada y Viola, 2007).

administró anisomicina en el hipocampo dorsal, 10 minutos de la aplicación intraperitoneal de los agonistas de catecolaminas.

Por otro lado, si los animales reciben un alto entrenamiento de EI step-down (los animales recibieron una intensidad de choque eléctrico de 0.5 mA) y se aplican antagonistas de los receptores D₁ y D₅ (SHC-23390) en el hipocampo dorsal, 10 minutos antes del entrenamiento, se produce un deterioro en la MLP. Este déficit amnésico es revertido, cuando los animales se les someten al protocolo de campo abierto, 50 minutos antes de la administración de los antagonistas dopaminérgicos. Bajo estas condiciones experimentales, se observó que si la anisomicina es aplicada en el hipocampo dorsal inmediatamente después de la exposición a la novedad y posteriormente se aplican los antagonistas, antes del entrenamiento de la tarea EI se pierde el efecto de recuperación de la memoria inducido por la novedad. Las conclusiones de este trabajo fueron que los receptores D₁ /D₅ y β₁ adrenérgicos son necesarios para la formación de la MLP. De este modo, la fortaleza de la MLP puede ser afectada eventualmente conduciendo a su formación o su deterioro (Moncada *et al.*, 2011). A pesar de las diferencias de protocolos, los trabajos de Moncada y colaboradores ofrecen una posibilidad para estudiar, si estos mecanismos se encuentran relacionados en nuestro modelo experimental referente la participación de otros sistemas de memoria que reciben y procesan la información de forma paralela. Por lo que queda aún por determinar el grado de participación del estrés en el efecto protector ocasionada por la anisomicina considerando que la intensidad del choque eléctrico podría generar diferentes respuestas de estrés.

En síntesis, es posible sugerir que el sobrerreforzamiento activa la participación de otros sistemas de memoria que reciben y procesan la información de forma paralela, lo que permite explicar el fenómeno de protección a la amnesia y la aceleración de la consolidación en la CI. Sin embargo, esta propuesta debe ser sujeta a la prueba experimental, con otras aproximaciones metodológicas de manera que permitan conocer a fondo los mecanismos cuales se ejerce el fenómeno de protección de la memoria.

6.3. Consideraciones acerca de la síntesis de proteínas en la formación de memoria a largo plazo

Durante las últimas dos décadas la mayor parte de los esfuerzos de investigación se han dirigido hacia el descubrimiento de la secuencia de acontecimientos que finalmente conducen a la

actividad impulsada por la transcripción y, en consecuencia la síntesis de proteínas. Sin embargo, investigaciones recientes han propuesto que la degradación de proteínas, también tiene un papel como un proceso regulador para el mantenimiento de trazos de memoria por periodos prolongados (Fioravante y Byrne, 2011).

La degradación de proteínas se lleva a cabo a través de tres rutas principales: 1) Las proteasas lisosomales, que son enzimas relativamente pequeñas que están presentes, prácticamente en todas las células de mamíferos excepto en los glóbulos rojos. 2) Las enzimas llamadas catepsinas que incluyen a las proteasas plasmáticas membranales, entre ellas las metaloendoproteasas; se encuentran asociadas a las membranas en las células o son secretadas y actúan fuera de las células como la colagenasa. 3) El sistema de proteosomas que envuelve a un sistema dependiente de ATP y de un polipéptido llamado ubiquitina. Las tres rutas principales han sido relacionadas con la regulación de la señalización celular y plasticidad sináptica. Aunado a lo anterior, una serie de investigaciones muestran evidencia de que el sistema ubiquitina-proteosomas está involucrado en el mantenimiento de la información a largo plazo, siendo hasta el momento, la única ruta de degradación de proteínas estudiada. (Fioravante y Byrne, 2011). Al respecto, Lopez-Salón y colaboradores entrenaron animales en la tarea de EI en la variante de step-down. Administraron lactacistina (un inhibidor de específico del sistema ubiquitina-proteosoma) en el hipocampo dorsal, 1 y 7 horas después del entrenamiento, se encontró un deterioro en la memoria. En contraste se observó que el tratamiento no tuvo efecto cuando este fue aplicado 10 horas después de la adquisición de la memoria.

Adicionalmente, los autores encontraron que la actividad proteolítica de la subunidad 26 de la proteína ubiquitina presentó un incremento por al menos 4 horas después de la adquisición del entrenamiento de EI (López-Salón *et al.*, 2001). Ésto sugiere que podrían representar los primeros eventos que desencadenen a la consolidación de la memoria (Fioravante y Byrne, 2011). De este modo, resultados similares fueron descritos por Artinian y colaboradores (2008), al administrar un inhibidor específico del sistema ubiquitina-proteosoma en el hipocampo y evaluar el efecto en la tarea de laberinto acuático de Morris⁷. Los resultados mostraron que existe una ventana de tiempo durante el cual la función del sistema ubiquitina-proteosomas es

⁷ En esta tarea el animal aprende a localizar una plataforma oculta en varias sesiones de entrenamiento mediante el uso de claves espaciales con el objetivo de escapar del agua (Fioravante y Byrne, 2011).

requerido inmediatamente después de la adquisición de la información, pero no se encontró que este fuera afectado por el tratamiento cuando se aplicó a las 3 horas después de la adquisición.

Todos estos resultados sugieren que la activación del sistema ubiquitina-proteosomas se requiere para la consolidación de la memoria, aunque se requiere de más estudios para determinar cuáles son las proteínas blanco y su significado funcional de su degradación en la formación de la MLP. Un estudio ha propuesto dos tipos de proteínas que son regulados por el sistema ubiquitina-proteosomas. Lee y colaboradores (2008) encontraron un incremento de poliubiquitanización de dos proteínas postsinápticas (shank y GKAP) en el hipocampo después del entrenamiento de la tarea de condicionamiento al miedo dependiente de clave⁸. Esto permite considerar que la degradación de proteínas conjuntamente a la transcripción y la traducción, tienen un papel como procesos reguladores para el mantenimiento de trazos de memoria por períodos prolongados. Es relevante mencionar que esta serie de evidencias han comenzado a replantear seriamente la teoría del requerimiento de síntesis de proteínas para la formación de la MLP, y se han buscado modelos alternativos.

Aunado a lo anterior, se ha reportado que la administración de anisomicina produce deficiencias en la memoria ocasionadas por sus efectos inespecíficos. Existe evidencia que demuestra que la anisomicina es un activador de dos cinasas: p38 y JNK pertenecientes a la gran familia de las MAPK (Routtenberg y Rekart, 2005; Jordanov *et al*, 1997), más no de ERK 1 y ERK 2 (Cano *et al.*, 1994). Se sabe que la vía de señalización p38 se activa cuando se genera depresión de largo plazo (LTD) (Ito-Ishida *et al.*, 2006) y ayuda al establecimiento de ciertas formas de plasticidad sináptica (Thomas y Huganir, 2004). En 1998, Berman y colaboradores reportaron que p38 no interviene en la consolidación de la tarea de aversión al sabor en la CI. Al mismo tiempo, hallaron que la vía de JNK se activa en la CI como consecuencia de la formación de esta memoria (Berman *et al.*, 1998). Si bien en esta tesis no se exploró la posibilidad de que la anisomicina alterara la MLP a través de la activación de las vías p38 o JNK, la evidencia sugiere, por un lado, que p38 no está involucrada en la memoria y por otro lado, que JNK promueve la formación de la memoria de aversión al sabor, por lo que si se

⁸El animal es colocado en una cámara donde tras escuchar un tono recibe una descarga eléctrica en las patas. Después de varias asociaciones entre estos dos estímulos se da como resultado la respuesta condicionada. La respuesta condicionada se manifiesta cuando se presenta el tono en la cámara; el animal despliega una conducta de inmovilidad (freezing). El porcentaje del tiempo en que el animal permanece inmóvil durante la presentación del tono se utiliza como índice de memoria (Johansen *et al.*, 2011).

potencia la actividad de esta vía, el resultado debería favorecer la memoria de la tarea. Sin embargo, esto se desconoce.

Recientemente el grupo de Gold demostró que la infusión intra-amigdalina de una dosis amnésica de anisomicina produce un exagerado incremento en la liberación de noradrenalina, dopamina y serotonina, entre 1000 y 17,000% por encima de los niveles basales medida en el sitio de la infusión. Este efecto inicial va seguido por un efecto tardío en el que hay una amplia y prolongada disminución en la liberación de estos neurotransmisores. El bloqueo de los receptores a noradrenalina de la amígdala al momento de las inyecciones de anisomicina, atenúa la amnesia producida por la anisomicina. (Canal, *et al.*, 2007; Qi y Gold, 2009). Del mismo modo, se corroboró en otro estudio que la aplicación de lidocaína y anisomicina en la amígdala, 130 y 120 minutos respectivamente antes del entrenamiento de la tarea El step-down se atenúa la amnesia y se incrementa la liberación de noradrenalina, respectivamente (Sadowski *et al.*, 2011). Los autores concluyeron que la amnesia producida por la anisomicina se debe a estos efectos inespecíficos y no a la inhibición de la síntesis de proteínas. Al mismo tiempo se ha sugerido que los efectos amnésicos de los inhibidores de la síntesis de proteínas, principalmente la anisomicina, desencadenan un aumento y acumulación prologando en la activación de genes de expresión inmediata temprana, lo que genera aumento en la transcripción y disminución de la síntesis de genes represores. Paradójicamente, estos efectos tienden involucrar a una hiperproducción en lugar de la reducción de las proteínas recién sintetizadas. Esta acción ejercida por los inhibidores de la síntesis de proteínas explicaría alguno de sus efectos sobre la MLP (Radulovic y Tronson, 2008).

Como se menciona anteriormente, este campo de estudio necesita de la formulación de nuevas hipótesis que reemplacen a la que hasta recientemente ha prevalecido, es decir, la hipótesis de la consolidación de la memoria que es dependiente de la síntesis de proteínas. Como parte de una de ellas, se ha propuesto que la síntesis de proteínas podría jugar un papel permisivo y no uno central en la formación de la memoria. Es decir que, las proteínas sintetizadas *de novo* tendrían una función homeostática de reponer otras proteínas, principalmente de aquellas con una vida media corta, con mayor susceptibilidad a proteólisis, y/o después de una estimulación intensa en donde el recambio de proteínas podría ser más acelerado, y que las proteínas ya existentes en la sinapsis serían las encargadas de producir los cambios que subyacen al trazo de memoria (Routtenberg y Rekart, 2005). De acuerdo con los

resultados obtenidos en la presente tesis, podría suponerse que al menos bajo condiciones de aprendizaje incrementado, la participación de las proteínas preexistentes es suficiente para la formación de MLP. En congruencia en lo anterior, algunos trabajos indican que la formación de la memoria podría requerir proteínas ya existentes. Un estudio realizado por Barnes y Thomas (2008) demostraron que la aplicación de anisomicina, nucleótidos antisentido contra el BDNF o tPA-STOP (un inhibidor de la activación de BDNF por proteólisis del precursor proBDNF) en el hipocampo dorsal deteriora la MLP en animales fueron entrenados en la tarea de miedo contextual y que depende de la activación de BDNF. Otros estudios demuestran que en ausencia de síntesis de proteínas pueden ocurrir la clase de cambios sinápticos persistentes que se piensa forman parte de los mecanismos subyacentes del almacenamiento. A partir de ello se han investigado los mecanismos intracelulares de la plasticidad sináptica, particularmente estudiando el papel de genes cuya transcripción y/o traducción es inducida en corto tiempo por la entrada de iones de calcio en la postsinapsis. A estos se les llama genes de expresión inmediata (GEI), y para su transcripción no requieren de la síntesis *de novo* de otras proteínas ni activación previa de otros genes (Miyashita et al., 2008). Debido al estrecho acoplamiento entre la actividad neuronal y la expresión de GEI, éstos han sido postulados como candidatos para llevar a cabo procesos de plasticidad en las conexiones entre las neuronas que subyacerían la memoria a largo plazo (Miyashita *et al.*, 2008). En este sentido, se ha descrito la participación de *Arc* en una forma de LTD que requiere de síntesis proteínas rápida y *de novo* en las dendritas, y que es independiente de los receptores NMDA. La activación de receptores mGluR1 induce en 5 minutos la traducción del ARNm de *Arc* que ya se encuentra en las dendritas (constitutivo), respuesta que es esencial para el desarrollo de LTD. A su vez la traducción de *Arc* necesita de la fosforilación del factor de elongación eucariótico por una cinasa que usualmente está unida a los mGluRs (eEF2 y eEF2K respectivamente, por sus siglas en inglés). Además de promover la síntesis de la proteína de *Arc*, eEF2 inhibe la elongación de las demás proteínas, por un mecanismo que aún no es bien comprendido (Park *et al.*, 2008).

La importancia de estos trabajos es que demuestran que en ausencia de síntesis de proteínas pueden ocurrir la clase de cambios sinápticos persistentes que se piensa forman parte de los mecanismos subyacentes del almacenamiento de la memoria de largo plazo y consecuentemente, los datos obtenidos en este trabajo no se encuentran en contradicción con dicha idea.

Perspectivas

- Sería provechoso evaluar el papel que juega la noradrenalina en la corteza insular, el hipocampo, estriado, sustancia negra compacta, y amígdala en entrenamiento incrementado de la tarea de evitación inhibitoria y asimismo analizar los niveles de este neurotransmisor como efecto ocasionados por la administración de anisomicina, para verificar la consistencia o generalización los datos presentados por el grupo de Gold.
- Más aún, sería conveniente explorar la interpretación aquí propuesta de la función de *Arc* y *BDNF* como posible mecanismo que permitiría explicar el fenómeno de protección a la amnesia observada en otras regiones cerebrales y posiblemente la aceleración almacenamiento de la memoria observado en la CI.
- Por supuesto, sería preciso verificar si la propuesta del fenómeno de protección a la amnesia y posiblemente la aceleración almacenamiento de la memoria podría potencialmente hacerse extensiva para otras tareas de aprendizaje como la versión de evitación activa.

7. CONCLUSIONES

- La administración de anisomicina en la corteza insular, inmediatamente después del entrenamiento de evitación inhibitoria, en los animales entrenados con intensidades altas de choque eléctrico no produjo amnesia, a pesar de los efectos inespecíficos de la anisomicina.
- La administración de anisomicina en la corteza insular, 30 minutos antes del entrenamiento de evitación inhibitoria, en los animales entrenados con intensidades altas de choque eléctrico produjo amnesia.
- Estos resultados indican que el efecto protector del aprendizaje incrementado (sobrreforzamiento) activa la participación de otros sistemas de memoria que reciben y procesan la información de forma paralela, lo que permitirían explicar el fenómeno de protección a la amnesia y posiblemente la aceleración almacenamiento de la memoria de la en la CI.

8. REFERENCIAS

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(2), 180-187.
- Afifi AK y Bergman RA. 2005. Neuroanatomía funcional. Texto y atlas.2ª ed. México D.F.:McGraw Hill.
- Agranoff, B. W., Davis, R. E., & Brink, J. J. (1965). Memory fixation in the goldfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *54*(3), 788-793.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walters, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.) New York: Garland Science.
- Ambrogi-Lorenzini, C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., & Tassoni, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*, *71*(1), 1-18.
- Artinian, J., McGauran, A.M., De Jaeger, X., Mouledous, L., Frances, B. & Rouillet, P. (2008). Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation, *European Journal of Neuroscience* *27*, 3009–3019.
- Atkinson, R. C., & Shiffrin, R. M. (1971). The control of short-term memory. *Scientific American*, *225*(2), 82-90.
- Baddeley, A. (1999). *Memoria humana. Teoría y práctica* Madrid: McGraw-Hill.
- Bahar, A., Samuel, A., Hazvi, S., & Dudai, Y. (2003). The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *European Journal of Neuroscience*, *17*(7), 1527-1530.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & Memory*, *15*(9), 618-624.
- Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M. C., Alen, N., Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 14599–14604.
- Barnes P y Thomas KL. 2008. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *Public Library of Science ONE*. *3*(9):e3248.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1967). Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *58*(1), 157-164.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, *53*(2), 261-277.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Neduva, V., & Dudai, Y. (2000). The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: Activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *The Journal of Neuroscience*, *20*(18), 7017-7023.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R., & Dudai, Y. (1998). Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste

-
- in the insular cortex of the behaving rat. *The Journal of Neuroscience*, 18(23), 10037-10044.
- Bermúdez-Rattoni F y McGaugh JL. (1991). Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research* 549, 165-170.
- Bermúdez-Rattoni F y Prado-Alcalá RA. (2001). Memoria. Dónde reside y cómo se forma. México, D.F.: Editorial Trillas.
- Bermúdez-Rattoni F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews Neuroscience*. 5, 209-217.
- Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison, I. B., & McGaugh, J. L. (1991). Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(12), 5379-5382.
- Bermúdez-Rattoni, F., Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2005). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 12(5), 447-449.
- Blitzer, R.D., Iyengar, R., & Landau, E.M. (2005). Postsynaptic signaling networks: cellular cogwheels
- Bramham, C.R., & Wells, D.G. (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 776-789.
- Braun, J. J., Lasiter, P. S., & Kiefer, S. W. (1982). The gustatory neocortex of the rat. *Physiological Psychology*, 10(1), 13-45.
- Bures, J., Bermudez-Rattoni, F. & Yamamoto, T. 1998. Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind: (pp. 1–10). Oxford Univ. Press, New York
- Canal, C. E., & Gold, P. E. (2007). Different temporal profiles of amnesia after intra-hippocampus and intra-amygdala infusions of anisomycin. *Behavioral Neuroscience*, 121(4), 732-741.
- Canal, C. E., Chang, Q., & Gold, P. E. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(30), 12500-12505.
- Cano, E., Hazzalin, C. A., & Mahadevan, L. C. (1994). Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Molecular and Cellular Biology*, 14(11), 7352-7362.
- Cechetto, D.F., & Saper, C.B. (1990). Role of the cerebral cortex in autonomic function. In *Central Regulation of Autonomic Function*. Oxford University Press, Oxford, UK
- Cobos-Zapíaín, G. G., Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavez, M., Quirarte, G. L., Roldán-Roldán, G., Díaz del Guante, M. A., & Prado-Alcalá, R. A. (1996). High level of footshock during inhibitory avoidance training prevents amnesia induced by intranigral injection of GABA antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory*, 65(3), 202-206.
- Cohen-Matsliah, S.I., Motanis, H., Rosenblum, K., & Barkai, E. (2010). A novel role for protein synthesis in long-term neuronal plasticity: maintaining reduced post burst after hyperpolarization. *Journal of Neuroscience* .30, 4338-4342.
- Cooper S.J. (2005). Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 28, 851-874.
-

-
- Cordero, M. I., Merino, J. J., & Sandi, C. (1998). Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *112*(4), 885-891.
- Cruz-Morales, S. E., Duran-Arevalo, M., Díaz del Guante, M. A., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1992). A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behavioral and Neural Biology*, *57*(3), 256-259.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*, *96*(3), 518-559.
- Davis, M., Rainnie, D., & Cassell, M. (1994). Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends in Neurosciences*, *17*(5), 208-214.
- Debiec, J., LeDoux, J. E., & Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, *36*(3), 527-538.
- Díaz del Guante, M. A., Rivas-Arancibia, S., Quirarte, G., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*, *38*(3-4), 49-53.
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, *91*(3), 310-314.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, *55*, 51-86.
- Duncan, C. P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *42*(1), 32-44.
- Duran-Arevalo, M., Cruz-Morales, S. E., & Prado-Alcalá, R. A. (1990). Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Research Bulletin*, *24*(6), 725-727.
- Ebbinghaus, H. (1885). Memory: A contribution to experimental psychology (1913, Trans.). In L. Duncker, H. A. Ruger & C. E. Bussenius (Eds.). New York: Teachers College, Columbia Univ.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, *31*, 47-59.
- Escobar, M. L., & Derrick, B. (2007). Long-term potentiation and depression as putative mechanisms for memory formation, en Bermúdez-Rattoni, F. (2007). Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging, Taylor & Francis Group: Florida
- Ezzeddine, Y., & Glanzman, D. L. (2003). Prolonged Habituation of the Gill-Withdrawal Reflex in *Aplysia* Depends on Protein Synthesis, Protein Phosphatase Activity, and Postsynaptic Glutamate Receptors. *The Journal of Neuroscience*, *23*(29), 9585-9594.
- Ferreira, G., Gutierrez, R., de la Cruz, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, *16*(6), 1139-1145.
- Fioravante, D., & Byrne, J.H. (2011). Protein degradation and memory formation. *Brain Research Bulletin* *85*, 14-20.
- Flexner, J. B., Flexner, L. B., & Stellar, E. (1963). Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science*, *141*, 57-59.
- Flexner, L. B., & Goodman, R. H. (1975). Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(11), 4660-4663.
-

-
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Orme, E., & Rosenzweig, M. R. (1975). Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis. *Physiology & Behavior*, *15*(1), 97-102.
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., & Orme, A. E. (1972). Influence of training strength on amnesia induced by pretraining injections of cycloheximide. *Physiology & Behavior*, *9*(4), 589-600.
- Flood, J. F., Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., & Orme, A. E. (1973). The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiology & Behavior*, *10*(3), 555-562.
- Freedman, L. S., Judge, M. E., & Quartermain, D. (1982). Effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, on mouse brain catecholamine biochemistry. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *17*(2), 187-191.
- Freeman, F. M., Rose, S. P., & Scholey, A. B. (1995). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiology of Learning and Memory*, *63*(3), 291-295.
- Galvez, R., Mesches, M. H., & McGaugh, J. L. (1996). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *66*(3), 253-257.
- Garín-Aguilar., M.E.,Quirarte, G.L., & Prado-Alcalá,R.A. (2003). Effect of Pre-training Intrahippocampal TTX on Over-learning. Program No.938.8. Neuroscience Meeting Planner,New Orleans, LA:Society.for Neuroscience Online.
- Gazarini, L., Stern, C. A., & Bertoglio, L. J. (2011). Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience.*Neuroscience* *179*, 179-187.
- Gutiérrez, H., Hernández-Echeagaray, E., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*, *89*(3), 751-758.
- Habib, D., & Dringenberg, H. C. (2010). Low-frequency-induced synaptic potentiation: a paradigm shift in the field of memory-related plasticity mechanisms? *Hippocampus* *20*, 29-35.
- Hartmann, M., Heumann, R., & Lessmann, V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *The EMBO Journal*, *20*(21), 5887-5897.
- Hilgard, E. R., & Bower, G. H. (1983). *Teorías del aprendizaje* México: Trillas.
- Huchín-Ramírez, T. C. (2007). *Efectos sobre la consolidación de la memoria producidos por el bloqueo de la síntesis de proteínas en la corteza insular* (Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro. .
- Hui, G. K., Figueroa, I. R., Poytress, B. S., Roozendaal, B., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2004). Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *81*(1), 67-74.
- Igaz, L. M., Vianna, M. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6781-6789.
- ILAR. (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals* Washington, DC: National Academy Press.

-
- Iordanov, M. S., Pribnow, D., Magun, J. L., Dinh, T. H., Pearson, J. A., Chen, S. L., & Magun, B. E. (1997). Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(6), 3373-3381.
- Ito-Ishida, A., Kakegawa, W., & Yuzaki, M. (2006). ERK1/2 but not p38 MAP kinase is essential for the long-term depression in mouse cerebellar slices. *The European Journal of Neuroscience*, *24*(6), 1617-1622.
- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., & Medina, J. H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behavioral and Neural Biology*, *58*, 16-26.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, *103*(1), 1-11.
- Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., & LeDoux JE. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, *147*(3):509-524.
- Katz, J. J., & Halstead, W. C. (1950). Protein organization and mental function. *Comparative Psychology Monographs*, *20*, 1-38.
- Korte, S. M., & De Boer, S. F. (2003). A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *European Journal of Neuroscience* *463*, 163-175.
- Lechner, H. A, Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). 100 Years of Consolidation-Remembering Müller and Pilzecker. *Learning. Memory* .*6*, 77-87.
- Lee, S. H., Choi, J. H., Lee, N., Lee, H. R., Kim, J. I., Choi, S. L, Yu, N. K., Lee, S. H, Kim, H., & Kaang BK. (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* *319*, 1253–1256.
- Lima, R. H., Rossato, J. I., Furini, C. R., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2009). Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiology Learning Memory* . *91*, 466-472.
- López-García, J. C., Fernández-Ruiz, J., Escobar, M.L., Bermúdez-Rattoni, F., & Tapia, R. (1993). Effects of excitotoxic lesions of the nucleus basalis magnocellularis on conditioned taste aversion and inhibitory avoidance in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* *45*, 147-152.
- López-Salón, M., Alonso, M., Vianna, M.R., Viola, H., Mello e Souza, T., Izquierdo, I., Pasquini, J.M. & Medina, J.H. (2001). The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation, *European Journal of Neuroscience* *14* 1820–1826.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* **84**, 87-136.
- Malenka, R. C. & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* *44*, 5-21.
- Martín, S. J., Grimwood, J. D., & Morris, G. M. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, *23*, 649-711.
- Martínez, J., Joel L., Jensen, R. A., & McGaugh, J. L. (1981). Attenuation of experimentally-induced amnesia. *Progress in Neurobiology*, *16*(2), 155-186.
-

-
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., & Escobar, M. L. (2011). Late Protein Synthesis-Dependent Phases in CTA Long-Term Memory: BDNF Requirement. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 61.
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 105-122.
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 205-210.
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2009). Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology (Berl)*, 202(1-3), 3-14.
- McGaugh, J. L., Westbrook, W. H., & Thomson, C. W. (1962). Facilitation of maze learning with posttrial injections of 5-7-diphenyl-1-3-diazadamantan-6-ol (1757 I.S.). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 55(5), 710-713.
- Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory* 14(10), 673-677.
- Mesulam, M. M., & Mufson, E. J. (1982). Insula of the old world monkey. I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 212(1), 1-22.
- Mileusnic, R. (2004). Protein Synthesis: II. New Proteins In Riedel, G., & Platt, (Ed.), *From Messengers to Molecules: Memories Are Made of These*. (pp. 550-564). Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, U.S.A.
- Mileusnic, R., Lancashire, C.L., & Rose, S.P. (2005). Recalling an aversive experience by day-old chicks is not dependent on somatic protein synthesis. *Learning & Memory*, 12(6), 615-619.
- Miranda, M. I., & McGaugh, J. L. (2004). Enhancement of Inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: Involvement of the basolateral amygdala. *Learning & Memory*, 11(3), 312-317.
- Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G. & Guzowski, J.F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 269-284.
- Moguel-González, M., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). BDNF reverses the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(3), 584-587.
- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of long-term memory by exposure to novelty requires protein synthesis: Evidence for a behavioral tagging. *Journal of Neuroscience* 27, 7476-7481.
- Moncada, D., Ballarini, F., Martínez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 12931-12936.
- Mowrer, O. H. (1951). Two-factor learning theory: summary and comment. *Psychological Review*, 58(5), 350-354.
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900). Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtnis. *Zeitschrift für Psychologie* 1, 1-288.
-

-
- Park, S., Park, J.M., Kim, S., Kim, J.A., Shepherd, J.D., Smith-Hicks, C.L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A.G., Haganir, R.L., Linden, D.J. & Worley, P.F. (2008). Elongation Factor 2 and Fragile X Mental Retardation Protein Control the Dynamic Translation of Arc/Arg3.1 Essential for mGluR-LTD. *Neuron*, 59, 70-83.
- Patterson, T. A., Rose, S. P., & Bradley, P. M. (1989). Anisomycin and amnesia in the chick: state-dependent effects are not present with intracranial injections. *Developmental Brain Research*, 49(2), 173-178.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Pérez-Ruiz C., & Prado-Alcalá, R.A. (1989). Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: protective effect of the negative reinforcer. *Brain Research Bulletin* 22, 599-603.
- Perlis, R. H., Holt, D. J., Smoller, J. W., Blood, A.J., Lee, S., Kim, B. W., Lee, M. J, Sun, M., Makris, N., Kennedy, D. K., Rooney, K., Dougherty, D. D, Hoge, R., Rosenbaum, J. F., Fava, M., Gusella, J., Gasic, G.P., & Breiter., H. C. (2008). Association of a polymorphism near CREB1 with differential aversion processing in the insula of healthy participants. *Archives of General Psychiatry* 65, 882-892.
- Pestka, S. (1971). Inhibitors of ribosome functions. *Annual Review of Microbiology*, 25, 487-562.
- Prado-Alcalá, R. A., & Cobos-Zapíaín, G. G. 1977. Learning deficits induced by cholinergic blockade of the caudate nucleus as a function of experience. *Brain Research* 138, 190-196.
- Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (1998). De la memoria y el cerebro. In R. De la Fuente & J. Alvarez-Leefmans (Eds.), *Biología de la mente* (pp. 245-256). México: El Colegio Nacional y Fondo de Cultura Económica.
- Prado-Alcalá, R. A., Bermúdez-Rattoni, F., Velazquez-Martinez, D. N., & Bacha, G. (1978). Cholinergic blockade of the caudate nucleus and spatial alternation performance in rats: Overtraining induced protection against behavioral deficits. *Life Sciences*, 23(9), 889-896.
- Prado-Alcalá, R. A., Grinberg-Zylberbaum, J., Alvarez-Leefmans, J., Gómez, A., Singer, S., & Brust-Carmona, H. (1972). A possible caudate-cholinergic mechanism in two instrumental conditioned responses. *Psychopharmacologia*, 25(4), 339-346.
- Prado-Alcalá, R. A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Arancibia, S., & Quirarte, G. (2007). Enhanced learning protects brain against effects of amnesic treatments. In F. Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging* (pp. 175-191). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Qi, Z., & Gold, P. E. (2009). Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. *Learning & Memory* 16(5), 308-314.
- Quartermain, D., & McEwen, B. S. (1970). Temporal characteristics of amnesia induced by protein synthesis inhibitor: determination by shock level. *Nature*, 228(5272), 677-678.
- Quevedo, J., Vianna, M. R. M., Roesler, R., de Paris, F., Izquierdo, I., & Rose, S. P. R. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: Protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning & Memory*, 6(6), 600-607.
- Quirarte, G. L, Cruz-Morales, S. E., Cepeda, A., Garcia-Montanez, M., Roldán-Roldán, G. & Prado-Alcalá, R. A. (1994). Effects of Central Muscarinic Blockade on Passive
-

-
- Avoidance: Anterograde Amnesia, State Dependency, or Both? *Behavioral and Neural Biology* 62, 15-20.
- Quirarte, G. L., Galvez, R., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*, 808(2), 134-140.
- Quirarte, G. L., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 14048-14053.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400-402.
- Radulovic, J., & Tronson, N. C. (2008). Protein synthesis inhibitors, gene superinduction and memory: too little or too much protein? *Neurobiology of Learning and Memory*, 89 (3), 212–218.
- Rodríguez-Serrano, L. M. (2010). *Efectos de la microinyección de anisomicina en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje mediado por niveles altos y bajos de reforzamiento* (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro. .
- Roozendaal, B., de Quervain, D. J, Ferry, B., Setlow, B., & McGaugh, J. L. (2001). Basolateral amygdala-nucleus accumbens interactions in mediating glucocorticoid enhancement of memory consolidation. *Journal of Neuroscience* 21, 2518-2525.
- Rose, S.P.R. (2000). God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learning and Memory* 7(1), 1-17.
- Rosenblum, K., Meiri, N., & Dudai, Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral and Neural Biology*, 59(1), 49-56.
- Routtenberg, A., & Rekart, J. L. (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends in Neurosciences*, 28(1), 12-19.
- Sabath, E. (2008). *Efecto del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en la corteza insular durante la formación de la memoria incidental de contexto*. (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro. .
- Sadowski, R.N., Canal, C. E., & Gold, P. E. (2011). Lidocaine attenuates anisomycin-induced amnesia and release of norepinephrine in the amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory* 96, 136–142.
- Salado-Castillo, R., Sánchez-Alavéz M., Quirarte, G. L., Martínez García, M. I. & Prado-Alcalá, R. A. (2011). Enhanced training protects memory against amnesia produced by concurrent inactivation of amygdala and striatum, amygdala and substantia nigra, or striatum and substantia nigra. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5, 1-7.
- Sewards, T. V., & Sewards, M. (2002). Separate, parallel sensory and hedonic pathways in the mammalian somatosensory system. *Brain Research Bulletin* 58, 243-260.
- Shi, C. J., & Cassell, M. D. (1998). Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 399(4), 469-491.
- Solana-Figueroa, R., Salado-Castillo, R., Galindo, L. E., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Effects of pretraining intrastriatal administration of p-chloroamphetamine on inhibitory avoidance. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(1), 178-185.
-

-
- Squire, L. R. & Barondes, S. H. (1974). Anisomycin, like other inhibitors of cerebral protein synthesis, impairs 'long-term' memory of a discrimination task. *Brain Research* 66, 301-308.
- Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1999). From mind to molecules In *Memory from mind to molecules*. New York: Scientific American Library.
- Thomas, G. M., & Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(3), 173-183.
- Thompson, R., Gibbs, R. B., Ristic, G. A., Cotman, C. W., & Yu, J. (1986). Learning deficits in rats with early neurotoxic lesions to the globus pallidus, substantia nigra, median raphe or pontine reticular formation. *Physiology & Behavior*, 37(1), 141-151.
- Tronson, N. C. & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 262-275.
- Vianna, M. R., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12251-12254.
- Wanisch, K., & Wotjak, C. T. (2008). Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 485-494.
- Watanabe, H., Takaya, T., Shimoi, T., Ogawa, H., Kitamura, Y., & Oka, K. (2005). Influence of mRNA and protein synthesis inhibitors on the long-term memory acquisition of classically conditioned earthworms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83(2), 151-157.
- Wright, C. I & Groenewegen, H. J. (1996). Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* 73, 359-373.
- Yamamoto, T. (2006). Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. *Archives of Histology and Cytology*, 69(4), 243-255.
- Yamamoto, T., Matsuo, R., Kiyomitsu, Y., & Kitamura, R. (1989). Taste responses of cortical neurons in freely ingesting rats. *Journal of Neurophysiology*, 61(6), 1244-1258
- Zhang, Y., Fukushima, H., & Kida, S. (2011). Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Molecular Brain* 19, 4,4.

9. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tablas

Tabla 1.	7
Tabla 2.	18
Tabla 3.	27
Tabla 4.	28
Tabla 5.	29
Tabla 6.	30

Figuras

Figura 1.	4
Figura 2.	14
Figura 3.	15
Figura 4.	16
Figura 5.	18
Figura 6.	22
Figura 7.	25
Figura 8.	28
Figura 9.	31
Figura 10.	32
Figura 11.	32
Figura 12.	34
Figura 13.	35
Figura 14.	37
Figura 15.	38
Figura 16.	39
Figura 17.	40
Figura 18.	41