



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL PAPEL DEL HIPOCAMPO EN LA FORMACIÓN DE MEMORIAS GUSTATIVAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

AZUL ISLAS HERNÁNDEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ARIANA ISRAELA BALDERAS MORENO

2015



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.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
LOS INICIOS	4
CLASIFICACIÓN DE LA MEMORIA	7
FASES DE LA MEMORIA	9
MEMORIA GUSTATIVA	11
HIPOCAMPO	13
ANISOMICINA	15
HIPÓTESIS	16
JUSTIFICACIÓN	16
OBJETIVO	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIAL Y MÉTODO	17
FÁRMACOS	18
PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL Y DISEÑO EXPERIMENTAL	18
ATENUACIÓN DE LA NEOFOBIA (AN)	18
CONDICIONAMIENTO DE AVERSIÓN AL SABOR (CAS)	18
EXTINCIÓN DEL CONDICIONAMIENTO AVERSIVO AL SABOR.	19
HISTOLOGÍA	19
RESULTADOS	20
LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EL HIPOCAMPO ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DE LA AN	20
EL HIPOCAMPO NO PARTICIPA EN LA ADQUISICIÓN DEL CAS MEDIANTE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS	21
LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EL HIPOCAMPO NO ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DEL CAS	22
LA EXTINCIÓN DEL CAS DEPENDE DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EL HIPOCAMPO.	23
HISTOLOGÍA	24
DISCUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	30

RESUMEN

La memoria gustativa es el proceso mediante el cual se forma el trazo de memoria de un sabor seguro o de un sabor asociado a aversión a partir de la presentación de un estímulo gustativo. Cuando se expone a una rata a un sabor nuevo esta presenta un consumo reducido del sabor, conocido como neofobia. Este fenómeno desaparece de manera gradual y el consumo incrementa desde la segunda presentación del sabor (atenuación de la neofobia) manifestando que la rata aprendió que es seguro consumirlo. Sin embargo, si se induce malestar gástrico después de la primera exposición al sabor, la rata mostrará un condicionamiento aversivo a ese sabor y evitará consumirlo de nuevo. Hasta ahora las investigaciones sobre la consolidación de memorias gustativas se han centrado en estructuras como la corteza insular y la amígdala, pero se ha evaluado muy poco la participación del hipocampo en este tipo de tareas. En este trabajo se evaluó el efecto de la inyección de un inhibidor de síntesis de proteínas durante la formación gustativa de un trazo de sabor seguro o asociado a aversión, usando la atenuación de la neofobia y el condicionamiento aversivo al sabor como modelos experimentales en ratas. Se observó que el bloqueo de la síntesis de proteínas en el hipocampo daña la memoria gustativa segura, pero no se observan alteraciones cuando la memoria a consolidarse tiene un componente aversivo. Así podemos observar que el hipocampo tiene una participación diferencial en la misma estructura dependiendo de las consecuencias del estímulo gustativo.

INTRODUCCIÓN

Nuestra individualidad está dictada por lo que hemos aprendido y por lo que podemos recordar. Aprendemos habilidades que nos permiten modificar y manejar nuestro ambiente y aprendemos un lenguaje para comunicar lo que hemos aprendido (Kandel et al., 2000). Estos procesos son cruciales para la sobrevivencia de los individuos, tratemos por un momento de imaginar que no podemos recordar cómo comunicarnos con los demás, o cómo llegar a nuestra casa o si quiera cuál es nuestro nombre. La memoria nos da identidad y nos permite adaptarnos conductualmente a un medio que se encuentra en constante cambio. Se define al aprendizaje como el proceso por el cual adquirimos conocimientos sobre el mundo y a la memoria como el proceso que permite que este conocimiento sea codificado y almacenado para después ser evocado (Kandel et al., 2000).

Los Inicios

La inquietud por saber cómo se procesa y almacena la memoria es muy antigua, en un principio ni siquiera se relacionaba al cerebro con este tipo de funciones. Franz Joseph Gall, a principios del siglo XIX, introdujo la idea de que el cerebro es el “órgano de la mente” y que se podían atribuir diferentes “facultades” a regiones específicas de la corteza cerebral (Rozenzweig, 1996). Gall solo se dedicaba a observar la superficie de los cráneos de las personas y de acuerdo a las formas que encontraba teorizaba sobre las capacidades tanto intelectuales como emocionales de estas, a este tipo de interpretaciones se le llamó Frenología (Milner *et. al.*, 1998). Más adelante, en 1861, Pierre Paul Broca observó que las lesiones en algunas regiones cerebrales llevaban a un déficit en el lenguaje; estos descubrimientos apoyaron la idea de que los procesos mentales, incluida la

memoria, podían ser localizados en puntos específicos del cerebro. Ya en 1940, Penfield observó que al estimular eléctricamente el lóbulo temporal de algunos pacientes que sufrían ataques epilépticos, obtenía una respuesta a la que llamó “respuesta de experiencia”. Lo que sucedía era que los pacientes, totalmente despiertos durante el procedimiento, al ser estimulados en esta área específica, recordaban experiencias pasadas. Con estos resultados se comenzó a asociar al lóbulo temporal con el almacenamiento de memorias (Kandel et al., 2000).

En 1885, Ebbinghaus publicó su tratado *Über das Gedächtnis* (“Acerca de la memoria”) en donde, usándose a sí mismo como sujeto experimental, creó una lista de sílabas sin sentido y se dio a la tarea de memorizarla. Tomando el tiempo que le llevaba memorizar la lista y el tiempo que le llevaba re-aprenderla después de un intervalo temporal, creó las curvas de aprendizaje y de olvido; la principal contribución de Ebbinghaus a estos estudios fue mostrar que la memoria se puede estudiar rigurosamente y siguiendo el método científico, contradiciendo las ideas que se tenían hasta el momento de que los procesos mentales eran imposibles de medir, que estaban fuera del alcance de la investigación (Lechner et al, 1999).

Después de Ebbinghaus, los conductistas Pavlov y Thorndike buscaron la manera de estudiar los procesos de aprendizaje y memoria en animales. Pavlov estudiaba los procesos fisiológicos de la digestión (estudios que le merecieron el premio Nobel en 1904) utilizando como animal experimental al perro. Medía la cantidad de salivación ante la presencia de comida. Después de varios ensayos en los que el experimentador entraba al cuarto donde se encontraba el perro llevando la comida, los perros respondían salivando a la sola presencia del experimentador, sin necesidad de tener contacto con la comida. Pavlov llamó a este fenómeno condicionamiento clásico, en el que se asocia un estímulo que provoca una respuesta incondicionada (en este caso la comida, que provoca la salivación

en el perro) a otro estímulo (la presencia del experimentador) y se provoca una respuesta condicionada (que el perro salive ante la sola presencia del experimentador, sin necesidad de oler o ver la comida) (Pavlov, 1927); este tipo de condicionamiento es ahora altamente utilizado en el campo de la investigación de la memoria.

Por otro lado, Thorndike estudió el aprendizaje desde otra perspectiva, él utilizó una “caja problema” en la que colocaba a un gato hambriento y comida fuera de la caja; para que este pudiera escapar y acceder a la comida tenía que accionar una palanca que abría la puerta de la caja; Thorndike observó que los animales se comportaban en un principio de manera azarosa, y conforme transcurrían los ensayos aprendían que accionar la palanca los liberaba de la caja, entonces disminuía su conducta azarosa y tardaban cada vez menos tiempo en accionarla. A este tipo de condicionamiento le llamó operante, ya que la conducta de los sujetos tiene que operar sobre su ambiente para lograr un objetivo (Thorndike, 1911).

La idea de que el lóbulo temporal es indispensable para la formación de ciertas memorias se confirmó en 1953, cuando Brenda Milner describió el caso de un paciente (H.M.) que sufría de graves ataques epilépticos que le impedían tener una vida normal. Los doctores localizaron y removieron las estructuras cerebrales en donde se localizaba el foco epiléptico, al hacerlo removieron bilateralmente el lóbulo temporal del paciente, incluyendo el hipocampo anterior, la amígdala y las cortezas entorrinal, perirrinal; sin embargo la corteza parahipocampal no fue afectada en su mayoría (Milner *et. al.*, 1998). Como consecuencia de esto, H.M. sufrió de una severa amnesia anterógrada y una pequeña amnesia retrógrada; después de la cirugía era incapaz de formar nuevas memorias. Al principio se pensó que el lóbulo temporal, removido en H.M, era el causante de la formación de todas las memorias, pero al probar al paciente en diversas tareas, Milner y Scoville observaron que había algunas en las que H.M. mejoraba con los ensayos, específicamente en tareas

de habilidad motora y aprendizaje reflexivo simple (habitación, sensibilización, condicionamiento clásico y operante). El paciente mejoraba en la realización de la tarea pero cuando se le señalaba que este mejoramiento lo había obtenido a través de la experiencia, él respondía con seguridad que nunca antes había realizado dicha tarea (Kandel et al, 2000).

Clasificación de la Memoria

De estas observaciones se dedujo que existían dos tipos de memoria. La primera depende de la integridad del lóbulo temporal y le da al organismo la capacidad para recordar conscientemente hechos y eventos (Milner, et al. 1998), a este tipo de memoria se le denomina memoria explícita o declarativa; es rápida, puede formarse incluso después de un solo entrenamiento e involucra la asociación de estímulos simultáneos (Kandel y Hawkins, 1992). Tulving dividió a la memoria explícita en memoria episódica, que codifica información sobre eventos y experiencias personales; y memoria semántica, que codifica información sobre hechos (Fig.1).

El otro tipo de memoria se conoce como memoria implícita o no declarativa, ésta implica cambios en habilidades, le da la capacidad al individuo de responder apropiadamente a un estímulo como resultado de la práctica y sucede sin que el sujeto sea capaz de describir que ha aprendido (Milner, et al 1998); este tipo de memoria no depende del lóbulo temporal, es más bien adquirido y retenido en sistemas motores y sensoriales debido a la plasticidad de estos (Kandel & Hawkins, 1992).

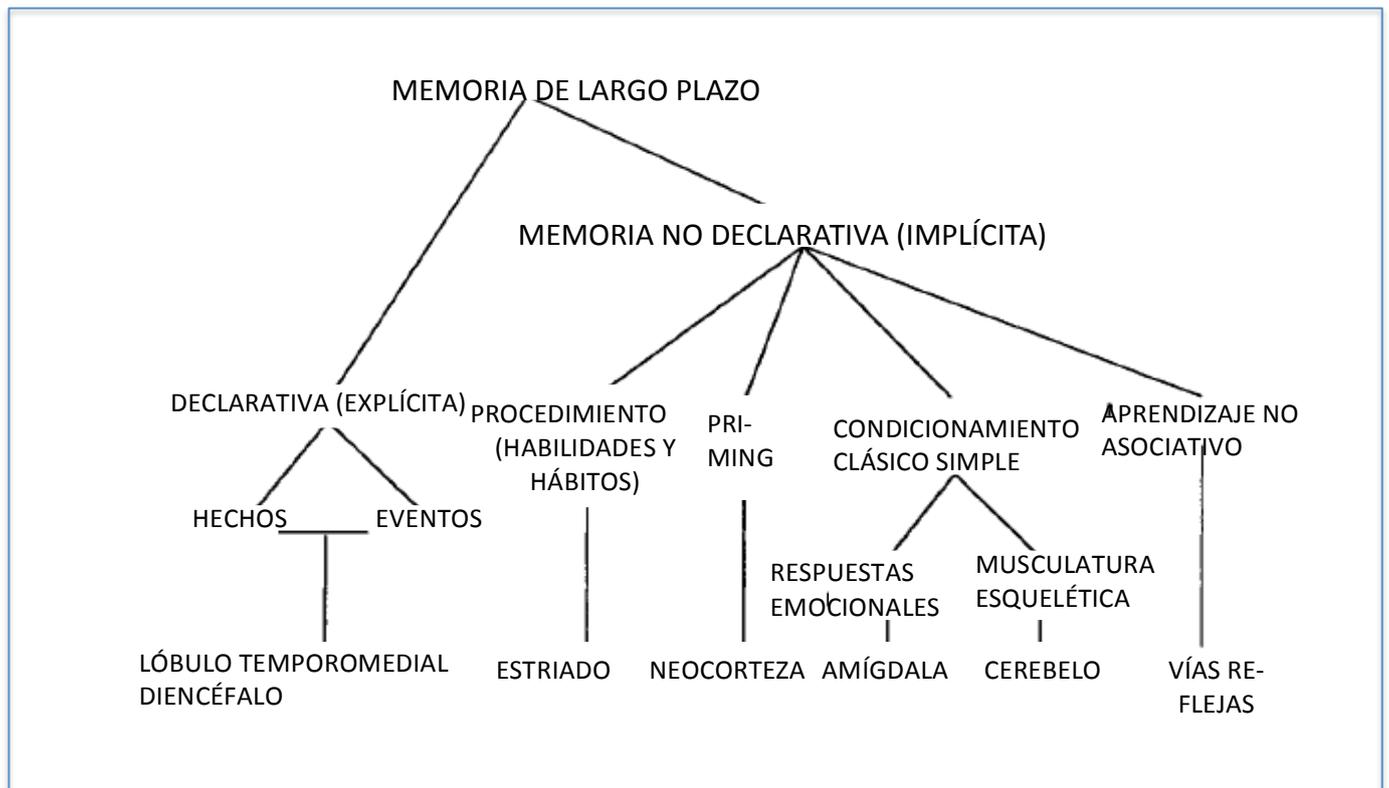


Fig. 1. Clasificación de la memoria según Squire (Modificado de Milner, et. al., 1998).

Una clasificación diferente surgió a partir de los trabajos de Ebbinghaus, en los que observó que al tratar de memorizar su lista de sílabas sin sentido, sólo era capaz de recordar alrededor de siete y que dentro de la primera hora después de haber estudiado la lista, su memoria era susceptible al olvido (Milner, *et.al.*, 1998). Estas observaciones llevaron a William James a proponer, en 1890, una división de la memoria de acuerdo a su duración. Propuso que la poca información que era posible retener inmediatamente después de estudiarla constituía una memoria primaria (ahora conocida como memoria de corto plazo, MCP) y la definió como el conocimiento que no es necesario evocar porque nunca ha abandonada el curso principal de nuestro pensamiento. Por el contrario, cuando la información adquirida ya no ocupa nuestra atención y dejamos de tener conciencia de ella, pasa a una forma de almacenamiento más duradera, a una memoria secundaria (o

memoria de largo plazo, MLP), que es almacenada por periodos de tiempo más largos y que puede ser extraída al evocar un recuerdo (Bermudez-Rattoni y Prado Alcalá, 2001).

Fases de la Memoria

Para su estudio, la memoria se ha dividido en distintas fases, cada una con características especiales. La primera fase para la formación de una memoria es la adquisición. Durante la adquisición, la información entra al organismo por medio de los sistemas sensoriales y los estímulos son reconocidos como nuevos o familiares, entonces comienza su codificación en áreas específicas del cerebro. La información que ha sido codificada puede permanecer como MCP, para la cual solo se requiere de cambios post-traduccionales en proteínas pre existentes; o bien puede atravesar un proceso llamado consolidación, después del cual la información permanecerá por semanas, años o incluso de manera permanente en el organismo, MLP. Para que suceda que una MCP pase a una MLP, es indispensable que ocurra la síntesis de nuevas proteínas que generen modificaciones para que ocurra un cambio ya sea en fuerza o en número de las sinapsis existentes (Milner, et al 1998.)

El estudio de la consolidación se remonta al año de 1900, con los trabajos de Müller y Pilzecker; estos investigadores, utilizando métodos parecidos a los antes descritos por Ebbinghaus, se dieron cuenta de que no se generan memorias instantáneas y duraderas después del aprendizaje, si no que la memoria toma tiempo para fijarse (o consolidarse) (Lechner et al, 1999). Propusieron que la memoria permanece vulnerable a interrupción después del aprendizaje por un periodo de tiempo, y que tiene que haber una “preservación” de ésta para que se pueda consolidar y formar parte de la MLP. Realizaron experimentos en los que a algunos sujetos se les daba una lista de palabras “A” para que la memorizaran y después de un corto periodo de tiempo se les daba una lista de palabras

“X” que distraía su atención de la primera lista, la prueba de memoria consistía en pedirles que recordaran la lista “A”; los sujetos a los que se les había presentado la lista “X” recordaban muchas menos palabras que aquellos a los que solo se les presentaba la lista “A”; es decir, que no tenían distractores, o como ellos lo llamaron, interferencia, por un segundo estímulo. Además, observaron que no importa la naturaleza del segundo estímulo, siempre que se presente éste, la memoria en la prueba se ve reducida. Con sus experimentos dedujeron que la consolidación era un proceso que se llevaba a cabo en aproximadamente 10 minutos, que era el tiempo en el que ya no observaban una interferencia tan fuerte del segundo estímulo con el primero (Lechner, et al. 1999).

Otros investigadores probaron el tiempo en el que ocurría la consolidación en modelos animales, pero sus resultados diferían de los 10 minutos que habían establecido Müller y Pilzecker, estas diferencias fueron atribuidas a que las tareas a las que eran sometidos los sujetos tenían características diferentes. A partir de las observaciones de los pioneros de la consolidación se creó la teoría de la interferencia, que establece que las memorias adquiridas cercanamente en el tiempo compiten por un espacio representativo en el cerebro, interfiriendo una con la otra (Lechner et al, 1999).

En 1949, Hebb formuló la teoría del trazo dual, que señala que la MCP se encuentra en forma de circuitos reverberantes neuronales, y que esta reverberación de la información induce cambios estructurales en las sinapsis de la red neuronal que está participando en la codificación de esta información, y esto permite que la memoria se almacene de forma permanente (Hebb, 1949). La idea de Hebb afianzó las observaciones de Müller y Pilzecker, y le dio a su teoría bases biológicas, además reforzó la idea de que se requería de síntesis de nuevas proteínas en las sinapsis participantes para lograr los cambios de los que hablaba Hebb.

Ahora sabemos que la consolidación empieza por una cascada de eventos moleculares en las neuronas, que llevan a la activación de factores transcripcionales en el núcleo, estos regulan la transcripción de ciertos genes que generan nuevas proteínas, algunas de las cuales producen cambios funcionales en las sinapsis y otras llevan a cambios estructurales, todo esto para almacenar una memoria de manera más o menos permanente (Lechner et al, 1999).

Después de la fase de consolidación, ocurre una fase que se denomina evocación, y que consiste en la recuperación de la información que fue adquirida y consolidada, para su utilización (Dudai, 2002; Kandel, 2000).

Memoria gustativa

La memoria de reconocimiento se refiere a la habilidad para acceder a la familiaridad de las cosas que hemos experimentado previamente (Bermúdez-Rattoni, 2004). Dentro de este tipo de memoria se cuenta a la memoria gustativa, durante la cual, un sujeto que se encuentra ante un sabor, al probarlo, debe distinguir si es nuevo o familiar, esto tiene gran importancia para la sobrevivencia del organismo, ya que durante el primer encuentro con un sabor, se realizan asociaciones con las consecuencias de su ingesta, esto permite al sujeto consumir más del sabor si tuvo consecuencias benéficas para él, o bien reducir su consumo o evitarlo del todo si tuvo consecuencias nocivas.

En el laboratorio utilizamos algunos paradigmas para estudiar las distintas fases de la memoria gustativa en ratas. Durante el primer encuentro con un sabor novedoso, el animal lo consume con recelo; esta respuesta neofóbica representa un mecanismo de defensa ante la ingesta de comida tóxica y se refleja en una baja en el consumo de este sabor con respecto al consumo normal de agua (Nachman y Jones, 1974). Si este sabor novedoso no le provocó algún malestar, es decir si no se realizaron asociaciones con algo

dañino, el animal aprenderá que el sabor es seguro, aumentando su consumo en presentaciones posteriores hasta llegar a una asíntota de consumo (Atenuación de la Neofobia, AN). En cambio, si el sabor es asociado a un malestar gástrico, cuando se encuentre con él por segunda ocasión, evitará su consumo ya que ha sido etiquetado como peligroso. Éste es un tipo de condicionamiento en el cual el sabor (estímulo condicionado) es pareado con malestar, por medio de la inyección de un inductor de malestar gástrico, por ejemplo cloruro de litio (LiCl, estímulo incondicionado), que provoca que el animal muestre en un segundo encuentro con el sabor, una respuesta condicionada que se observa en la disminución en el consumo con respecto al primer día, indicando que el animal recuerda las consecuencias que le provocó el sabor la primera vez; a este condicionamiento se le conoce como condicionamiento de aversión al sabor o CAS. Después de que se ha realizado esta asociación, es posible lograr que el animal re-aprenda a que ahora ese sabor, que había asociado a algo dañino, ya no le causa malestar, esto se logra presentando en más ocasiones el sabor sin la inyección del inductor de malestar gástrico, a este nuevo aprendizaje se le llama extinción del CAS. La siguiente figura es una representación de la conducta observada durante el aprendizaje gustativo (Fig. 2).

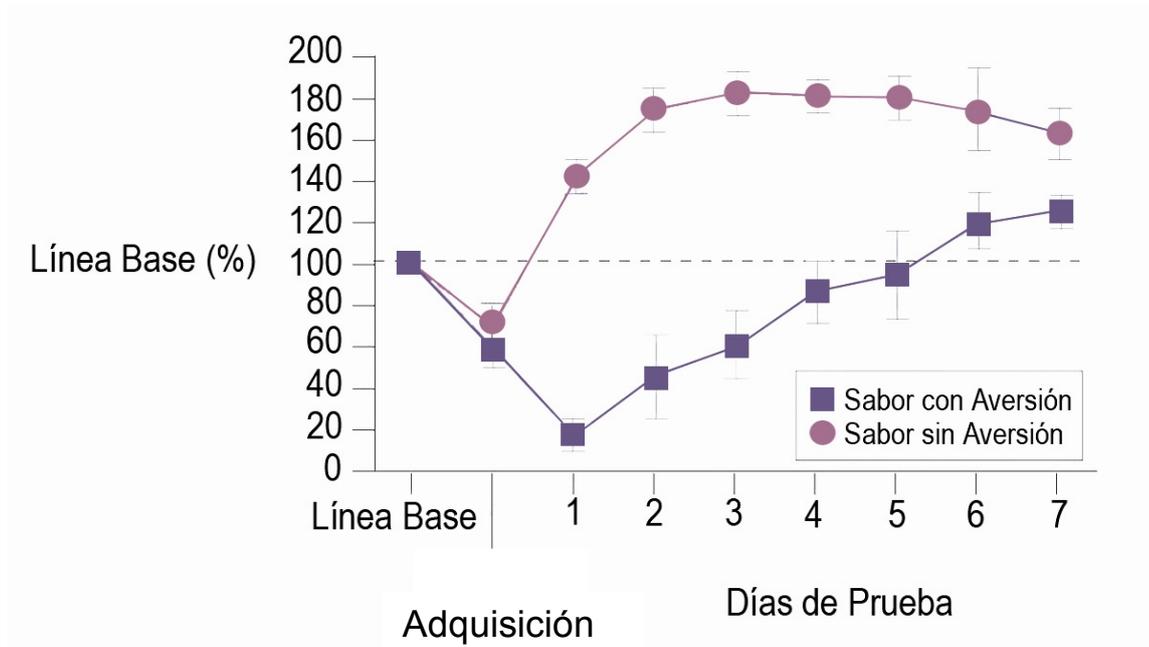


Fig. 2: Representación de la conducta durante el aprendizaje gustativo. (Modificado de Bermúdez Rattoni, 2004)

Hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral que, desde los trabajos de Milner con el paciente H.M., se ha relacionado con la formación y almacenamiento de eventos nemónicos. La formación hipocampal está localizada en la profundidad de la porción media del lóbulo temporal. Comprende dos regiones que incluyen el hipocampo y el giro dentado. A su vez, el hipocampo es una estructura que comprende cuatro estratos nombrados por Lorente de Nó como cuernos de Amón 1, 2, 3 y 4 (CA1, CA2, CA3 y CA4), principalmente conformadas por células piramidales. La parte superior del hipocampo corresponde a CA1 y se caracteriza por presentar una capa de neuronas piramidales muy empacadas. El área CA3 está unida con el giro dentado por medio de la vía de las fibras musgosas y es la porción inferior del hipocampo. CA1 y CA3 se conectan a través de la vía colateral de Schaffer. Las células piramidales de CA3 inervan al área CA1 (Fig. 3).

Además, se sabe que el hipocampo tiene conexiones indirectas con la corteza insular, que se ha encontrado es una estructura esencial para la formación y almacenamiento de procesos mnemónicos gustativos (Lavanoux y Amaral, 2000).

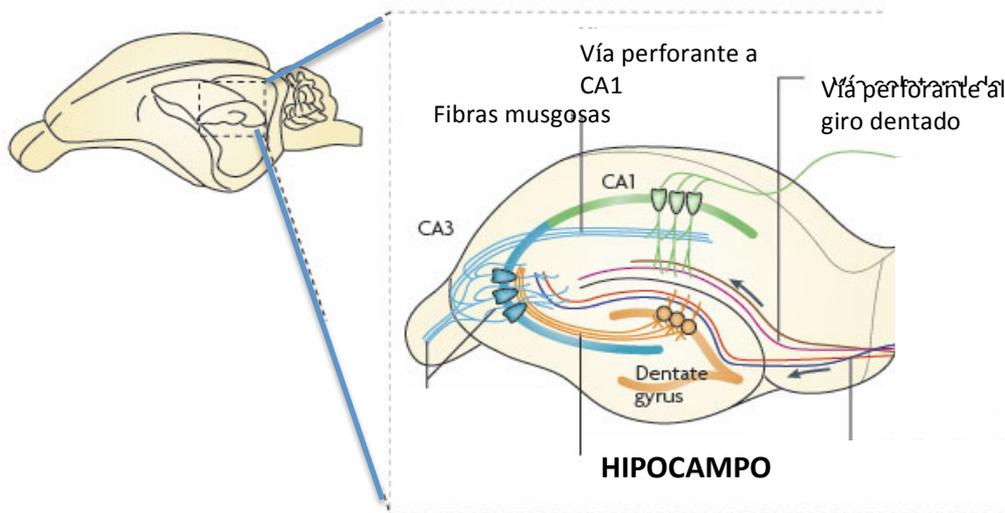


Fig. 3. Esquema de las vías aferentes y eferentes del hipocampo (Modificado de Guilherme Neves, et al., 2008).

Se han generado algunas hipótesis acerca de la manera en la que el hipocampo puede estar participando en la adquisición y/o consolidación de nuevas memorias, y en el almacenamiento de éstas. En general, se propone al hipocampo como una estructura en la que la memoria permanece por un corto periodo de tiempo ya que cuando deben pasar a un almacenamiento de largo plazo esta estructura deja de participar y la memoria es transferida a estructuras corticales que es en donde se realiza el almacenamiento de largo plazo (Dudai Y., 2004).

Existe evidencia, por un lado, que lesiones excitotóxicas del hipocampo de ratas, provocan que éstas tengan menor neofobia que los animales que tienen íntegro el hipocampo;

además, las ratas con lesiones de esta índole muestran en un condicionamiento de aversión a los sabores, menor aversión que las ratas no lesionadas (Krane, et. al.1976). También se han encontrado diferencias en la adquisición del CAS, las ratas con lesión en el hipocampo muestran menos aversión que las ratas no lesionadas (Miller, et. al., 1971).

Por otro lado, existen también experimentos en los cuales los animales con el hipocampo lesionado y los animales no lesionados se comportan de la misma manera en cuanto a consumo en la neofobia y CAS (Smotherman, et. al. 1981). Stone y cols., en el 2005, inyectando muscimol (que es un agonista selectivo de receptores GABA_A) inactivaron el hipocampo y observaron una mejora en el condicionamiento de aversión al sabor en estos animales en comparación con el grupo control (Stone et. al. 2005).

Existen entonces evidencias opuestas acerca del papel que tiene el hipocampo en la formación de memorias gustativas, en este estudio analizaremos la participación del hipocampo en la consolidación de la memoria de reconocimiento de sabores. Una forma de hacerlo es midiendo el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo, ya que se ha descrito que la síntesis de proteínas es indispensable para que ocurra la formación de la memoria a largo plazo (Davis and Squire 1984).

Anisomicina

La anisomicina es un antibiótico bacteriano, aislado de *Streptomyces griseolus*, es un inhibidor de la síntesis de proteínas, que se une a los ribosomas eucariontes en la subunidad 60S y actúa en la subunidad grande del ribosoma y que inhibe la formación de los enlaces peptídicos (Ioannou, et. al., 1998), es decir, la actividad peptidil-transferasa de estos.

Como mencionamos antes, la consolidación de la memoria depende de síntesis de proteínas de novo, por lo cual, para diferenciar que tipos de memoria son consolidados por ciertas estructuras cerebrales, la microinyección local de inhibidores de la síntesis proteica, como la anisomicina, representa una herramienta muy importante.

HIPÓTESIS

El hipocampo participa de manera diferencial en la consolidación de la memoria gustativa, participando en la consolidación de memorias aversivas y no así en la consolidación de memorias seguras.

JUSTIFICACIÓN

El papel del hipocampo en la consolidación de memorias espaciales ha sido ampliamente comprobado; sin embargo, no se ha logrado establecer su participación durante la formación de memorias gustativas. En este trabajo nos planteamos determinar la participación del hipocampo durante la consolidación de la memoria gustativa segura y aversiva.

OBJETIVO

Evaluar el papel del hipocampo en la consolidación de la memoria gustativa segura y aversiva.

Objetivos particulares

- 1) Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo durante la formación de la memoria de atenuación de la neofobia.
- 2) Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo para la formación de la memoria de condicionamiento al sabor.
- 3) Determinar si es necesaria la síntesis de proteínas en el hipocampo para que ocurra la extinción de la memoria de condicionamiento al sabor.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos

Para todos los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de entre 280 y 300 grs. al inicio de los experimentos, obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Se mantuvieron en cajas individuales de acrílico en un ambiente externo controlado de 22 ± 1 °C, con un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, con comida *ad libitum*; el consumo de líquidos solo se limitó durante los procedimientos conductuales. Los experimentos y manipulaciones fueron realizados durante la fase de luz.

Implantación de cánulas guía

Las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (83.5 mg/kg) y xilazina (8.6 mg/kg). Una vez anestesiadas, mediante cirugía estereotáxica, se les implantaron cánulas guía bilateralmente, colocadas 1 mm por encima del hipocampo dorsal: AP -3.6 mm; L \pm 3.0 mm y DV -2.3 mm, coordenadas a partir de bregma (según el atlas para rata de Paxinos y Watson, 1998). Las cánulas fueron fijadas al cráneo de la rata por medio de dos tornillos y acrílico dental y se les colocaron mandriles para prevenir obstrucciones. Las ratas tuvieron al menos 5 días de recuperación antes de que se iniciaran los procedimientos conductuales.

Microinyección

Las ratas fueron manipuladas días previos al día de la inyección para evitar estrés. El día de la inyección, los mandriles se removieron de las cánulas y se realizó la microinyección introduciendo una aguja dental conectada por medio de una tubería de polietileno a jeringas Hamilton de 10 μ l montadas en una bomba automática de microinyección (Carnegie Medicin). Se inyectó un volumen de 1 μ l, a una tasa de 1 μ l/min por hemisferio y el inyector se mantuvo dentro un minuto más para permitir la difusión apropiada del fármaco.

Fármacos

Se utilizó anisomicina (Sigma) como inhibidor de la síntesis proteica en una concentración de 120 mg/ml, a la cual se le agregó una cantidad equimolar de HCl y se disolvió en solución vehículo (Líquido Cerebro Espinal Artificial: NaCl 125mM, KCl 5mM, NaHPO₄ · H₂O 1.25mM, MgSO₄ · 7H₂O 1.5mM, NaHCO₃ 26mM, glucosa 10mM CaCl₂ 2.5mM) ajustando después el pH a 7.4.

Procedimiento conductual y diseño experimental

Atenuación de la Neofobia (AN)

Las ratas fueron privadas de líquidos por 24 hrs. Los siguientes tres días recibieron 30 ml de agua, en probetas graduadas de plástico, durante 15 min y su consumo fue medido para obtener una tasa del consumo de líquido diario (línea base). El día siguiente (día 4), la adquisición de la tarea consistió en presentar 30 ml de una solución de sacarina sódica (0.3%), durante 15 min. Inmediatamente después de la presentación de sacarina, los animales fueron inyectados bilateralmente con anisomicina o solución vehículo, dependiendo del grupo al que pertenecían. La prueba de memoria se realizó 24 horas después (día 5), presentando nuevamente una solución de sacarina sódica 0.3%, durante 15 minutos. Para evitar deshidratación, los animales recibieron un consumo de agua 4.5 horas después de cada presentación de sacarina.

Condicionamiento de Aversión al Sabor (CAS)

Para el condicionamiento de aversión al sabor, el procedimiento fue el mismo que en la AN, solo que el día de la adquisición (día 4), 15 minutos después del consumo de sacarina 0.3%, se les aplicó una inyección intraperitoneal de una solución de LiCl 0.2 M, en una dosis de 10ml/kg de peso de la rata, utilizado como inductor de malestar gástrico. Inme-

diatamente después, o bien, inmediatamente antes de la presentación de sacarina, dependiendo el grupo al que pertenecían los animales, se realizó la microinyección de anisomicina o solución vehículo en el hipocampo. La memoria de largo plazo fue medida 24 horas después presentando una solución de sacarina sódica 0.3% por 15 minutos nuevamente. Las ratas tuvieron acceso a un consumo de 15 min de agua 4.5 horas después de cada presentación de sacarina para evitar deshidratación.

Extinción del Condicionamiento Aversivo al Sabor.

Para la extinción del CAS se realizaron dos condicionamientos de aversión al sabor; después, en el sexto día, se presentó a los animales nuevamente una solución de sacarina sódica 0.3%, pero esta vez sin la inyección i.p. del inductor del malestar gástrico (LiCl), este mismo día se realizó la inyección en el hipocampo de anisomicina o solución vehículo a los animales, dependiendo del grupo en el que estaban incluidos, inmediatamente después de la presentación del estímulo condicionado, es decir, en la primera extinción. Los días siguientes, se siguió presentando el estímulo condicionado sin el apareamiento con el estímulo incondicionado para observar una curva de extinción.

Histología

Al finalizar todos los experimentos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital y perfundidos con solución de NaCl 0.9%. Los cerebros fueron removidos y colocados en formaldehído al 4% durante 48 h, después fueron tratados en un gradiente de sacarosa (10%, 20%, 30%) durante 3 días. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 40 μm a los que se les realizó la tinción de Nissl para observar en un microscopio de luz el correcto sitio de la microinyección.

Análisis estadístico

El análisis se realizó mediante diferentes pruebas estadísticas. Para analizar el día de la prueba, se utilizó una prueba t no pareada para observar diferencias entre el grupo control y el experimental. Para analizar dos mediciones en el mismo grupo, se utilizó una prueba t pareada, comparando la línea basal de agua con la primera presentación de sacarina, o bien la primera presentación de sacarina con respecto a la segunda.

RESULTADOS

La síntesis de proteínas en el hipocampo es necesaria para la consolidación de la AN

Los grupos mostraron una robusta respuesta neofóbica, medida como una reducción en el consumo de solución de sacarina con respecto a la línea base (Fig. 4 $t_{19}=13.45$; $p<.0001$). En los días 5 y 6 el grupo tratado con anisomicina administrada inmediatamente después de la primera presentación de sacarina (Fig. 4 flecha azul, día 4) aún muestra una respuesta neofóbica comparada con el grupo vehículo ($t_{16}=-3.6$, $p=0.0023$; $t_{16}=-2.2$, $p=0.042$ respectivamente). A partir de la cuarta presentación (día 7) de sacarina no se encuentran diferencias significativas ($t_{16}=-1.46$, $p=0.16$; $t_{16}=-1.37$, $p=0.1826$ respectivamente) del grupo inyectado con anisomicina con respecto al inyectado con solución vehículo. Esto indica que la anisomicina no induce un efecto permanente ya que en las subsecuentes presentaciones hay un incremento en la ingesta de sacarina que alcanza el valor de los animales control, observándose, en ambos grupos, una atenuación de la neofobia.

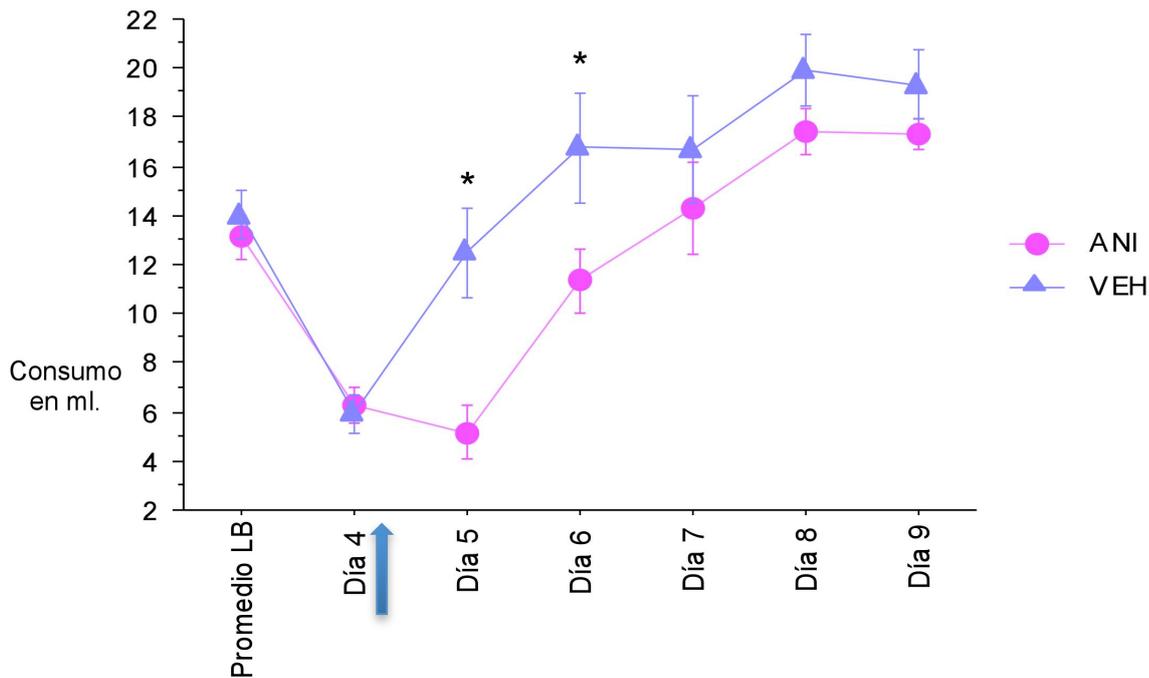


Fig.4. Cada punto representa el volumen promedio de consumo diario de sacarina 0.3%. La anisomicina (rosa) o solución vehículo (morado) se microinyectó en el hipocampo dorsal región CA1 inmediatamente después de la primera presentación de sacarina (mostrado con una flecha azul, día 4). *** $p < 0.0001$ comparación entre grupos.

El hipocampo no participa en la adquisición del CAS mediante la síntesis de proteínas

Al igual que en el paradigma de la AN, los grupos mostraron una respuesta neofóbica evidente $t_{21}=8.94$, $p<0.0001$, comparación entre el promedio LB y el día 4. Se microinyectó a las ratas con anisomicina o bien con solución vehículo, dependiendo el grupo al que pertenecían e inmediatamente después de la inyección, se les realizó la adquisición del CAS. Los grupos no muestran diferencias significativas $t_{21}=0.67$; $p=0.52$ (Fig. 5, día 5) por lo que la anisomicina inyectada antes de la sacarina no tiene efecto sobre la adquisición o consolidación del CAS.

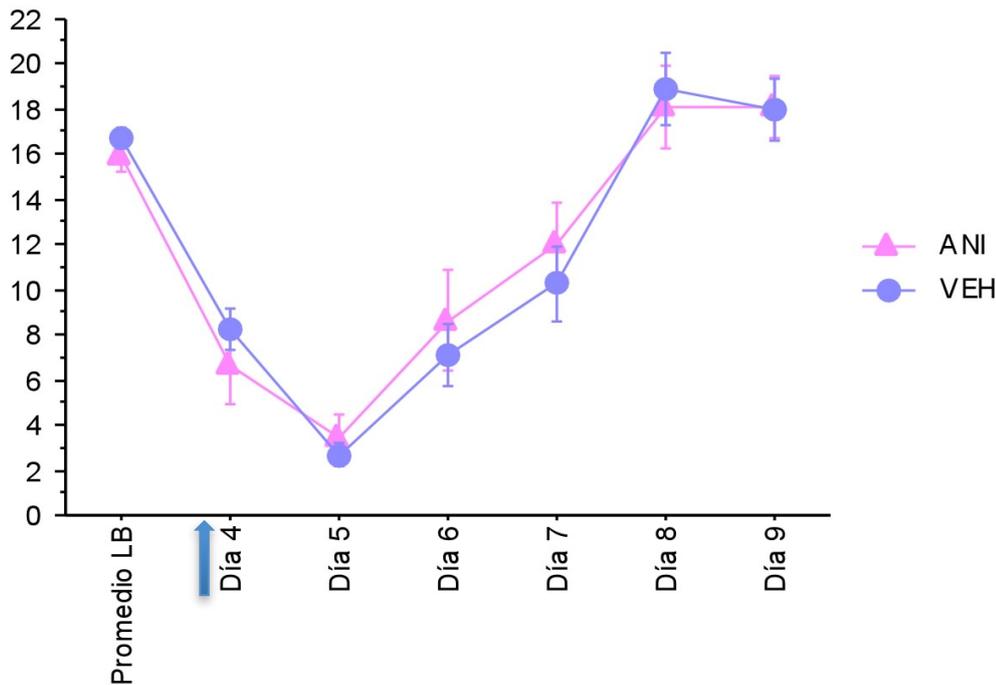


Fig. 5. Cada punto representa el volumen promedio de consumo de agua y sacarina de cada día. La anisomicina (rosa) o solución vehículo (morado) se microinyectó en hipocampo dorsal región CA1, inmediatamente después de la primera presentación de sacarina (flecha azul, día 4), 15 minutos después se inyectó intraperitonealmente el inductor de malestar gástrico (LiCl 0.2 M). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ningún día.

La síntesis de proteínas en el hipocampo no es necesaria para la consolidación del CAS

Los grupos mostraron una robusta respuesta neofóbica, medida como una reducción en el consumo de solución de sacarina con respecto a la línea base (Fig. 6 $t_{15}=8.94$; $p<.0001$).

Para el caso de la microinyección de anisomicina inmediatamente después de la presentación de sacarina, tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos ($t_{15}=0.67$, $p=0.51$, día 5) (Fig. 6). Con estos datos podemos concluir que la anisomicina no afecta la adquisición o la consolidación del CAS bajo este protocolo. Es importante men-

cionar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos los días 7, 8 y 9.

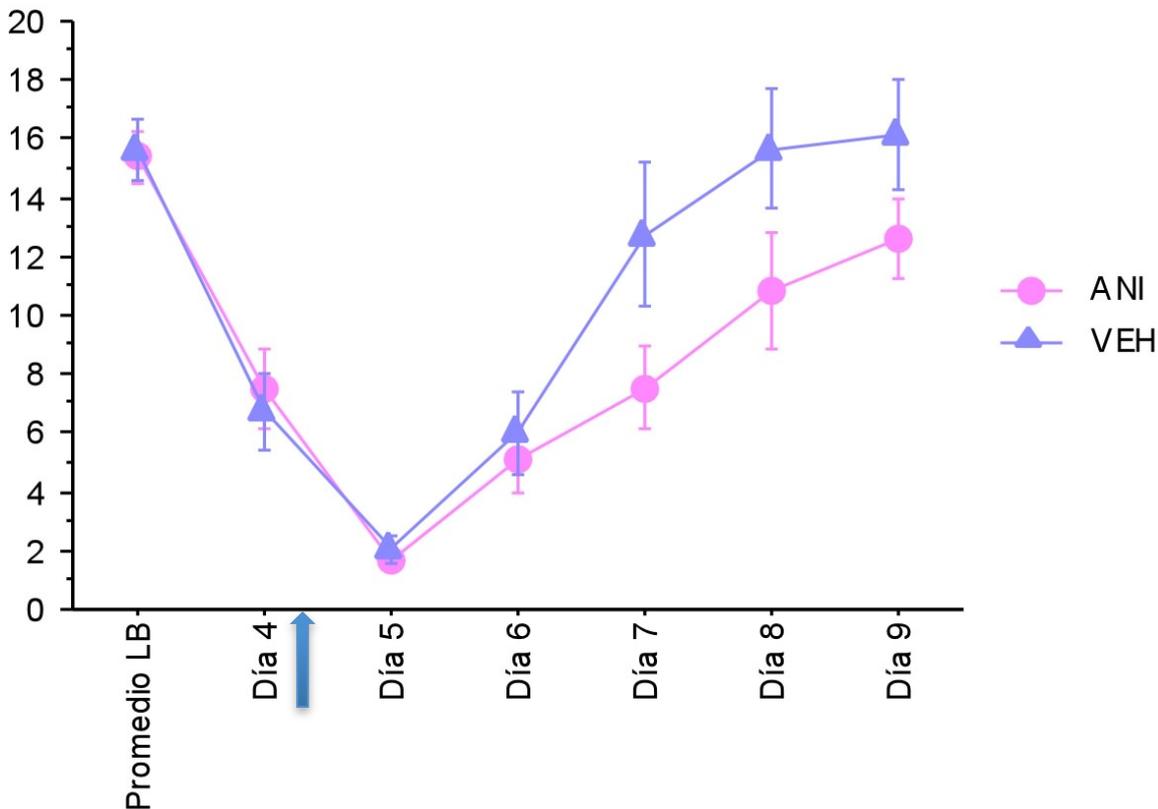


Fig. 6. Cada punto representa el volumen promedio de consumo de agua y sacarina durante cada día. La anisomicina (rosa) o solución vehículo (morado) se microinyectó en hipocampo dorsal región CA1 inmediatamente después del CAS (flecha azul, día 4), 15 minutos después se inyectó intraperitonealmente el inductor de malestar gástrico (LiCl 0.2 M). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos los días 7, 8 y 9.

La extinción del CAS depende de la síntesis de proteínas en el hipocampo.

Cuando se realizó la microinyección de anisomicina en el hipocampo en el día 6 inmediatamente después de la segunda adquisición del CAS y se realizó la prueba de memoria

para la extinción del CAS 24 horas después (día 6), los resultados muestran diferencias significativas entre grupos los días 7, 8 y 9 ($t_{12}=2.6$, $p=0.02$; $t_{12}=2.3$, $p=0.04$ y $t_{12}=2.3$, $p=0.03$ respectivamente) (Fig. 7) lo que indica que hubo un efecto sobre la extinción del CAS. Con estos datos podemos concluir que la anisomicina afecta la consolidación de la extinción del CAS, bajo nuestro protocolo.

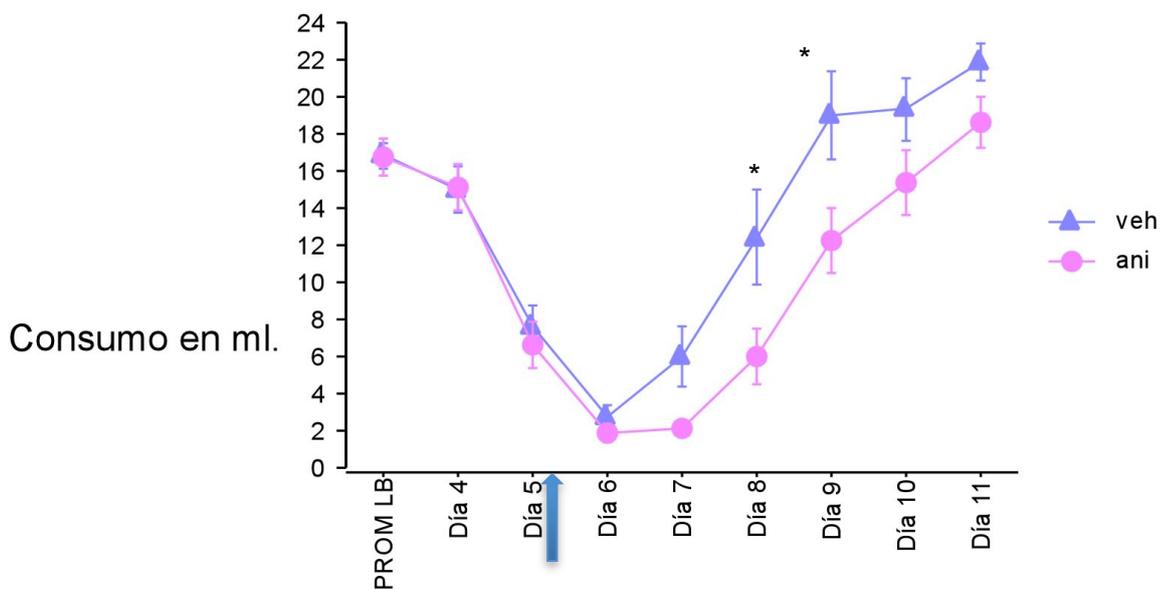


Fig. 7. Cada punto representa el volumen promedio de consumo de agua y sacarina durante cada día. La anisomicina (rosa) o solución vehículo (morado) se microinyectó en el hipocampo dorsal región CA1 inmediatamente antes de la segunda adquisición del CAS (flecha azul, día 5) y la memoria se probó 24 horas después (día 7). *** $p<0.0001$ comparación entre grupos.

Histología

El análisis histológico de los cerebros mostró que el sitio de inyección en la región CA1 del hipocampo dorsal se realizó con éxito en un 90% de los implantes. Los animales a los que no se les implantó la cánula en el lugar correcto fueron eliminados de los análisis estadísticos y gráficas en este trabajo. La figura 8 muestra una foto representativa de la correcta canulación de los animales.

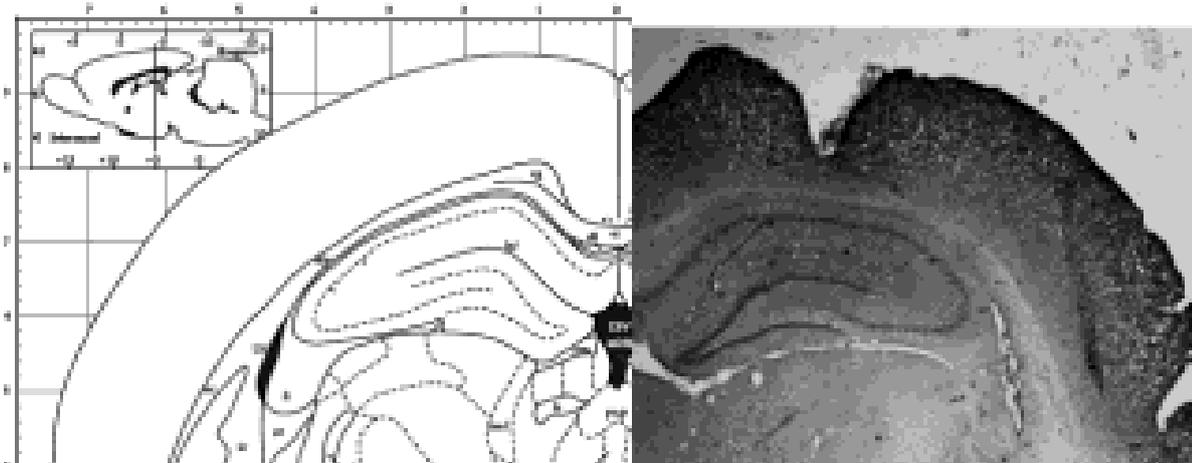


Fig.8. La cánula guía se localizó en la región CA1 del hipocampo dorsal, microfotografía representativa de un corte coronal del hipocampo dorsal (derecha). Esquema de la región CA1 del hipocampo dorsal (Tomado de Paxinos & Watson, 1997) (izquierda).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que el hipocampo participa en la consolidación de memorias gustativas seguras, pero no en la de memorias gustativas aversivas, como lo es el caso del CAS.

El hipocampo ha sido relacionado fuertemente con procesos mnemónicos espaciales. Broadbent y colaboradores lesionaron por medio de inyecciones intra-cerebrales bilaterales de ácido iboténico el hipocampo de ratas. Las lesiones iban de un 5 a 30%, de 30 a 50%, de 50 a 75% y de 75 a 100% (Fig. 9) del hipocampo y los animales fueron probados en una tarea espacial (laberinto acuático de Morris) en la cual el animal se coloca en una tina llena de agua y debe aprender a llegar, por medio de pistas espaciales en el ambiente, a una plataforma que está localizada por debajo del nivel de agua (Fig. 10). Además fueron probadas en una tarea que no involucra reconocimiento o codificación del contexto (memoria de reconocimiento de objetos, ORM), en la que se aprovecha la tendencia natu-

ral de los roedores para explorar más los objetos novedosos que los familiares y consiste en habituar al animal al cuarto, al experimentador y a la caja en la que se lleva a cabo el experimento, después de esto, el animal se coloca en la caja con dos objetos idénticos y se le permite su exploración, la prueba consiste en colocar al animal en la misma caja, pero ahora con una copia del objeto presentado previamente (objeto familiar) y un objeto que nunca había sido presentado (objeto nuevo) y se espera que la rata explore más el objeto nuevo. En sus experimentos se demuestra que las memorias espaciales son dependientes de la integridad del hipocampo, porque lesiones de más del 30% en esta estructura impiden la formación de la memoria del laberinto acuático, mientras que las memorias independientes de hipocampo se pueden formar aún con un 50-75% de lesión. (Broadbent et al. 2004)

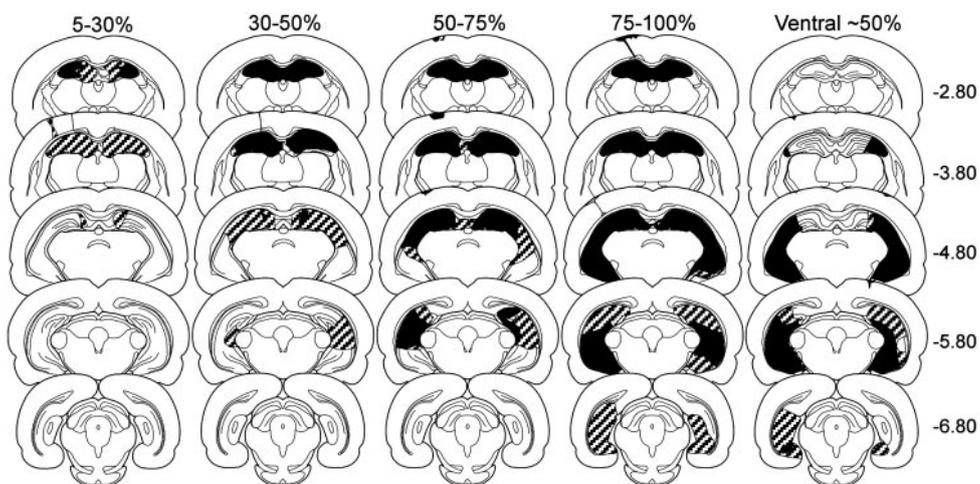


Fig.9. Esquema representativo del tipo de lesiones realizadas en los trabajos de Broadbent et al. 2003. (Broadbent et al. 2003)

Los mismos resultados se obtuvieron con inyección de anisomicina en el hipocampo en las mismas tareas (Balderas *et. al*, 2008).

Los trabajos anteriores indican que el hipocampo juega un papel importante, presumiblemente por medio de la síntesis de proteínas, para la consolidación de memorias espacia-

les y es probable que sea esta estructura en la que se realiza la asociación entre los estímulos y el contexto.

En particular, para las memorias gustativas se ha propuesto que el incremento en la ingesta de soluciones familiares que no son asociadas con consecuencias gástricas negativas o malestar, constituye una forma de memoria asociativa (Kalat y Rozin, 1973). Podemos decir que para la consolidación de memorias seguras, dónde no interviene ningún estímulo negativo, como sucede con la AN y la extinción del CAS, se realiza una asociación entre el estímulo gustativo y la ausencia de consecuencias negativas/malestar o bien la presencia de señales seguras (Kalat & Rozin, 1973), pero se ha propuesto que la asociación que se realiza no es exclusivamente con una ausencia del estímulo incondicionado, si no con otros elementos que están presentes al momento de consumir el estímulo gustativo, como por ejemplo, el contexto espacial y/o temporal.

Sutherland y Rudy propusieron la Teoría de la Asociación Configurativa, que dice que se requiere de la integridad del hipocampo para poder realizar correctamente una tarea en la que se tiene que recordar la relación entre dos o más estímulos condicionados (Sutherland y McDonald, 1990). “El hipocampo es esencial para la construcción y modificación de representaciones en las que se generan relaciones entre objetos. Este tipo de representaciones se caracterizan como una organización sistemática de ítems en la memoria, en los cuales, los hechos y los eventos están atados entre sí por un amplio espectro de relaciones: causales, lógicas, temporales, etc.” (Eichenbaum, 1999.)

En 1986, Hall y Chanell probaron que la inhibición latente se afecta si se cambia de ambiente a los animales (Hall y Chanell, 1986). Posteriormente, el grupo de Gallo encontró que después de aprender una aversión a solución salina en un contexto particular o en un momento del día particular, la extinción de esta aversión dependía tanto del lugar como del momento del día en que se realizaba el aprendizaje (Moron et al, 2002). En otro estu-

dio del mismo grupo en 2005 se encontró que el hipocampo participa seleccionando pistas temporales durante la consolidación de la memoria segura de sabores. Este grupo reportó que lesiones excitotóxicas del hipocampo dorsal impedían el efecto de un cambio contextual entre la pre-exposición y el condicionamiento (Molero et al., 2005). Estos estudios apoyan la idea de que el contexto, no solo espacial si no también temporal, está íntimamente relacionado con la consolidación de memorias gustativas, y sugiere la participación del hipocampo mediante el reconocimiento del contexto temporal en el que se lleva a cabo el aprendizaje gustativo.

En este trabajo observamos que en el caso del CAS, la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo no tiene ningún efecto y de acuerdo a las evidencias arriba mencionadas, parece razonable proponer que la diferente participación del hipocampo en la consolidación de una u otra memoria gustativa se debe a que las memorias aversivas son evolutivamente más importantes para un animal que las memorias seguras, debido a que la integridad física, incluso la vida, dependen del recuerdo de qué consecuencias han tenido los alimentos en el organismo.

El condicionamiento clásico puede ser entendido como un aprendizaje sobre las relaciones temporales o causales entre estímulos externos e internos, para permitir una respuesta apropiada antes de que un evento significativo ocurra. En este sentido, la capacidad para asociar una respuesta inmune o algún estado fisiológico con un estímulo externo específico, representa un alto valor adaptativo. Se ha especulado que esta capacidad se adquirió durante el proceso de evolución como una estrategia adaptativa para proteger al organismo y/o prepararlo para el peligro. Ante la presencia de un estímulo gustativo aversivo, se produce una respuesta adaptativa, consistiendo primero en modificaciones del comportamiento, para evitar el lugar o la comida asociados con la aversión, si esto no es posible, entonces el individuo tratará de reducir al máximo el contacto con el estímulo

aversivo. Al mismo tiempo el sistema inmune estaría preparando al cuerpo para la interacción con el antígeno resultante de este contacto. Es fundamental entonces, que se pueda hacer una categorización de “seguro” o “peligroso” (Schedlowski, et al. 2010).

El CAS es una tarea que requiere del reconocimiento y evasión de comida potencialmente letal. En esta tarea se realiza una asociación entre el estímulo gustativo y una consecuencia negativa del consumo de dicho estímulo. En este sentido, algunos trabajos han probado que la amígdala participa en el proceso de adquisición y consolidación de memorias con componentes emocionales, como en este caso lo es la tarea del CAS, además de que, para el reconocimiento del estímulo gustativo otra estructura esencial es la corteza insular (Bermúdez-Rattoni, 2004). En este sentido, nuestros resultados concuerdan, el CAS no se ve afectado por el bloqueo de la síntesis de proteínas; sin embargo, nos queda explicar el porqué si participa en memorias no aversivas, en nuestro caso, la AN y la extinción del CAS.

Tomando en cuenta lo anterior, sería posible hablar del hipocampo como un primer relevo en el que se almacena inicialmente el estímulo gustativo, y posteriormente, si este no tiene consecuencias negativas para el organismo, el trazo de memoria que se formará dependerá de la síntesis de nuevas proteínas en el hipocampo; en cambio, si se presentan consecuencias negativas, el trazo se fortalece valiéndose de otras estructuras dada su importancia biológica (por ejemplo, de la amígdala o de la corteza insular) y el hipocampo ya no juega un papel fundamental en la consolidación del trazo de memoria, por lo cual, su inactivación no afecta, en este caso particular, al CAS.

En conclusión, nuestros resultados sugieren fuertemente la participación del hipocampo en la consolidación de memorias gustativas seguras, posiblemente por que el hipocampo ayuda a que se realicen asociaciones entre el estímulo gustativo y las pistas espaciales y/o temporales. Esto podría ocurrir debido a que la asociación se vuelve poco relevante

cuando el estímulo gustativo resulta aversivo o dañino para el animal, por lo que el hipocampo deja de ser una estructura relevante para la consolidación de esa memoria, y su inactivación o el bloqueo de la síntesis de proteínas no afecta la permanencia a largo plazo de dicha memoria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. Learn Mem. 2008 Ago 21;15(9):618-24.
2. Bermúdez-Rattoni F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. Nat Rev Neurosci. 2004 Mar;5(3):209-17.
3. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5;101(40):14515-20. Epub 2004 Sep 27.
4. De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermudez-Rattoni F. Medial temporal lobe structures participate differentially in consolidation of safe and aversive taste memories. Eur J Neurosci. 2008 Oct;28(7):1377-81.
5. Dudai Y, Eisenberg M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. Neuron. 2004 Sep 30;44(1):93-100.
6. Dudai Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. Curr Opin Neurobiol. 2002 Abril;12(2):211-6.
7. Eichenbaum H. Neurobiology. The topography of memory. Nature. 1999 Dic 9;402(6762):597-9.

8. Hall G, Channell S. Context specificity of latent inhibition in taste aversion learning. Q J Exp Psychol B. 1986 May;38(2):121-39.
9. Ioannou M, Coutsogeorgopoulos C, Synetos D. Kinetics of inhibition of rabbit reticulo-lyocyte peptidyltransferase by anisomycin and sparsomycin. Mol Pharmacol. 1998 Jun;53(6):1089-96.
10. Kalat JW, Rozin P. "Learned safety" as a mechanism in long-delay taste-aversion learning in rats. J Comp Physiol Psychol. 1973 May;83(2):198-207.
11. Kandel ER, Hawkins RD. The biological basis of learning and individuality. Sci Am. 1992 Sep;267(3):78-86.
12. Krane RV, Sinnamon HM, Thomas GJ. Conditioned taste aversions and neophobia in rats with hippocampal lesions. J Comp Physiol Psychol. 1976 Jul;90(7):680-93.
13. Lavenex P, Amaral DG. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. Hippocampus. 2000;10(4):420-30.
14. Lechner HA, Squire LR, Byrne JH. 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. Learn Mem. 1999 Mar-April;6(2):77-87.
15. Miller CR, Elkins RL, Peacock LJ. Disruption of a radiation-induced preference shift by hippocampal lesions. Physiol Behav. 1971 April;6(4):283-5.
16. Milner B, Squire LR, Kandel ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. Neuron. 1998 Mar;20(3):445-68.
17. Milner D. Cognitive neuroscience: the biology of the mind and findings and current opinion in cognitive neuroscience. Trends Cogn Sci. 1998 Nov 1;2(11):463.
18. Molero A, Moron I, Angeles Ballesteros M, Manrique T, Fenton A, Gallo M. Hippocampus, temporal context and taste memories. Chem Senses. 2005 Ene;30 Suppl 1:i160-1. Erratum in: Chem Senses. 2008 Feb;33(2):225.

19. Moron I, Ballesteros MA, Candido A, Gallo M. Taste aversion learning and aging: a comparison with the effect of dorsal hippocampal lesions in rats. *Physiol Res.* 2002;51 Suppl 1:S21-7.
20. Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Ene;9(1):65-75.
21. Rosenblum K, Schul R, Meiri N, Hadari YR, Zick Y, Dudai Y. Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 14;92(4):1157-61.
22. Rosenzweig MR. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu Rev Psychol.* 1996;47:1-32.
23. Sara SJ. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.* 2000 Mar-Abril;7(2):73-84.
24. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2000 Invierno;12(1):103-13.
25. Smotherman WP, Burt G, Kimble DP, Strickrod G, BreMiller R, Levine S. Behavioral and corticosterone effects in conditioned taste aversion following hippocampal lesions. *Physiol Behav.* 1981 Oct;27(4):569-74.
26. Smotherman WP, Kolp LA, Coyle S, Levine S. Hippocampal lesion effects on conditioned taste aversion and pituitary-adrenal activity in rats. *Behav Brain Res.* 1981 Ene;2(1):33-48.
27. Stone ME, Grimes BS, Katz DB. Hippocampal inactivation enhances taste learning. *Learn Mem.* 2005 Nov-Dic;12(6):579-86.
28. Sutherland RJ, McDonald RJ. Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. *Behav Brain Res.* 1990 Feb 12;37(1):57-79.