



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE ANISOMICINA EN LA CORTEZA
PREFRONTAL SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA DE UN
APRENDIZAJE MEDIADO POR NIVELES ALTOS Y BAJOS DE
REFORZAMIENTO**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARISOL HERNANDEZ AVILA

TUTOR
DR. ROBERTO A. PRADO ALCALÁ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA MAGDALENA GIORDANO NOYOLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. MARÍA ESTHER OLVERA CORTÉS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE MICHOACAN IMSS

CAMPUS UNAM-JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO. OCTUBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al cuerpo académico y estudiantil del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que me enseñaron y compartieron en el ámbito académico y personal, mientras cursé la Maestría en Ciencias (Neurobiología), gracias a todos.

A mi tutor, Dr. Roberto A. Prado Alcalá, por dejarme formar parte de su equipo de trabajo, guiarme durante mi estancia en el laboratorio y sobre todo por la paciencia que mostró durante todo el proceso de aprendizaje.

A las Dra. Esther Olvera y Dra. Magda Giordano, por el tiempo que dedicaron en la revisión y comentarios del presente trabajo, que me permitieron enriquecerlo al verlo desde sus perspectivas.

A los miembros de mi jurado de examen la Dra. Sofía Díaz Miranda, Dra. María Eugenia Garín Aguilar, Dra. Magda Giordano, Dr. Pavel Rueda Orozco y al Dr. Roberto Prado Alcalá, por las correcciones, preguntas y aportaciones hechas sobre este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, donativo 237570 y beca 424315); y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT (IN201415) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al gobierno del Estado de México, por otorgarme la beca para la realización de mi estancia estudiantil realizada en el Instituto de Neurociencias de Alicante, España.

A las unidades de apoyo del INB-UNAM Campus Juriquilla:

Bioterio: M.V.Z. Martín García Servín.

Cómputo: Ing. Ramón Martínez Olvera, Ing. Alberto Lara Ruvalcaba, Ing. Omar González Hernández e I.S.C. Sandra Hernández García.

Enseñanza: Mtra. Leonor Casanova Rico.

Videoconferencia: Lic. Ma. De. Lourdes Lara Ayala.

Biblioteca: Lic. Francisco Javier Valles Valenzuela y Lic. Soledad Medina Malagón.

A los miembros del Laboratorio de Aprendizaje y Memoria, especialmente a la Dra. Cristina Medina Fragoso, por su tiempo, colaboración y consejos técnicos para la realización de este trabajo.

A la Dra. Gina Lorena Quirarte, por los comentarios al trabajo y por el apoyo personal durante mi estancia en el laboratorio.

A la M.V.Z. Norma Serafín López, por el apoyo académico que me brindo, sobre todo por el tiempo invertido.

A la Sra. Bertha Islas, por su invaluable apoyo en el cuidado de los animales.

A mis compañeros de laboratorio, sin ustedes el laboratorio no hubiese sido lo mismo, sin sus puntos de vista y conocimientos que me ofrecieron para el desarrollo tanto del trabajo como de mi persona.

Gracias a mis amigos que estuvieron para apoyarme en mis proyectos, por cuidarme, escucharme y siempre sacarme una sonrisa, estando cerca o a larga distancia: Ame, Paco, Chayo, Eli, Edna, Osvaldo, Monse, Nadia, David y Annie.

Al Dr. Roberto Ovilla Martínez y Dr. Eli Skromne Eisenberg por las segundas y terceras oportunidades que brindan, gracias por la dedicación y cariño con la que realizan su trabajo.

Finalmente, a toda mi familia por creer en mí y apoyarme en todo momento.

Dedicatoria

A mis padres Ismaela Ávila Arenas y Guillermo Hernandez Sauza, por su cariño, paciencia y todo el apoyo que me han dado.

A mis hermanos Geronimo y Gaby del Carmen Hernandez Ávila, por alentarme, cuidarme y malcriarme lo mejor que pudieron.

Resumen

La corteza prefrontal, particularmente sus regiones más ventrales, como las cortezas prelímbica e infralímbica, se ha visto asociada con procesos emocionales, cognoscitivos y mnemónicos, así como con la modulación de la codificación de la memoria asociada al miedo. En este trabajo estudiamos la participación de la corteza prelímbica (CxPL) en el proceso de la consolidación de la memoria. Se ha visto que, con intensidades moderadas de reforzamiento, la aplicación de inhibidores de la síntesis de proteínas durante el proceso de consolidación, en diferentes regiones cerebrales, como el estriado e hipocampo, puede causar un efecto amnésico; sin embargo, con intensidades altas de reforzamiento este efecto amnésico no ocurre. En este trabajo se administró anisomicina (31.25 µg/0.5 µL,) o solución salina (vehículo) 30 minutos antes del entrenamiento, en la corteza CxPL de ratas macho de la cepa Wistar, entrenadas en la tarea de evitación inhibitoria, con un reforzador moderado (1.0 mA), o intenso (2.0 mA o 3.0 mA). La anisomicina produjo un estado amnésico solamente en el grupo entrenado con 1.0 mA. Los resultados de los diferentes controles demuestran que el efecto amnésico no se debió a dependencia de estado, ni a alguna alteración en la etapa de la adquisición. Estos datos indican que la actividad normal de la CxPL es esencial para la consolidación de la memoria de aprendizajes moderados, pero no en condiciones de entrenamiento intenso.

Summary

The prefrontal cortex, particularly its most ventral regions, i.e., prelimbic cortex (CxPL) and infralimbic cortex, has been associated with mnemonic, emotional, and cognitive processes, as well as with the modulation of encoding of fear memory. In this work, we studied the participation of CxPL in the process of memory consolidation. It has been found that with moderate intensities of a negative reinforcer, administration of inhibitors of protein synthesis during the consolidation phase, in different regions such as the striatum and hippocampus, can cause an amnesic effect; however, with higher intensities of the reinforcer memory is protected against this amnesic effect. In the present experiment anisomycin (31.25 mg / 0.5 μ L,) or saline (vehicle), was administered in CxPL of male rats of the Wistar strain 30 minutes before training in an inhibitory avoidance task, with a moderate (1.0 mA), or intense (2.0 mA or 3.0 mA) reinforcer. Anisomycin produced an amnesic state only in the group that had been trained with 1.0 mA. Results of control manipulations demonstrated that the amnesic effect was not due neither to state-dependency, or impairment of acquisition. These data indicate that the normal activity of the CxPL is essential for memory consolidation of moderate learning, but not in conditions of intense training.

Índice	Página
1.0 Introducción	1
2.0 Antecedentes	1
2.1 Memoria	1
2.2 Teoría de la consolidación de la memoria	3
2.3 Síntesis de proteínas	4
2.4 Inhibidores de la síntesis de la síntesis de proteínas	5
2.5 Papel de la corteza prefrontal prelímbica en la memoria	7
3.0 Justificación	10
4.0 Hipótesis	11
5.0 Objetivo general	12
5.1 Objetivos particulares	12
6.0 Método	13
6.1 Sujetos de experimentación	13
6.2 Cirugía estereotáxica	13
6.3 Manipulación	14
6.4 Aparatos	14
6.5 Evitación inhibitoria (EI)	15
6.6 Tratamiento	16
6.7 Análisis histológico	16
6.8 Análisis estadístico	17
7.0 Experimento 1. Curva de intensidad	18
7.1 Resultados experimento 1	19
8.0 Experimento 2. Memoria de corto plazo	20
8.1 Resultados experimento 2	22
9.0 Experimento 3. Dependencia de estado	23
9.1 Resultados experimento 3	25
10.0 Discusión	26
11.0 Conclusión	32
12.0 Referencias bibliográficas	33

Apéndices

I	Abreviaturas	41
II	Índice de figuras	42
III	Índice de tablas	43

1.0 Introducción

El estudio de la memoria ha sido del interés de diversos campos del conocimiento por muchos años, y para tratar de comprenderla se han propuesto diferentes hipótesis acerca de cómo se desarrolla. Así, han surgido varias clasificaciones de la misma. Un concepto importante, que debe ser diferenciado del de la memoria, es el del aprendizaje, que se define como un cambio en la conducta relativamente permanente, derivado de una experiencia (Hilgard y Bower, 1983), mientras que la memoria sería la capacidad de conservar la información adquirida a través del aprendizaje (Kandel, 2001).

Una de las primeras clasificaciones acerca de la memoria fue propuesta por William James en 1890, que la dividió en primaria y secundaria, conocida ahora como memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP), respectivamente. Una de las hipótesis más relevantes e interesantes del siglo pasado fue la propuesta por Georg Elias Müller y Alfons Pilzecker, en 1900, quienes propusieron la existencia del proceso de la consolidación, a través del cual la MCP se transfiere a MLP. Este postulado también deja ver que, durante la consolidación, la memoria es lábil, mientras que una vez consolidada, la memoria ya no es sensible a eventos o a tratamientos que puedan interferir con ella (McGaugh, 2015; Prado-Alcalá et al., 2007).

2.0 Antecedentes

2.1 Memoria

La memoria, como almacén de información derivado de la experiencia, ha sido el tema de un gran número de investigaciones (Prado-Alcalá, 1998). Desde 1804 Maine de Biran, escribía sobre la mecánica de la memoria, la memoria sensible, y la memoria representativa, dándonos un indicio de cuánto tiempo lleva este tema sobre la mesa. Bergson (1910) nos dice que, si bien la memoria ya no representa nuestro pasado, actúa sobre él y que si todavía conserva el nombre de memoria no

es por que conserve imágenes de antaño, sino porque prolonga su efecto útil en el presente momento (Squire, 2004).

La memoria puede diferenciarse en tres etapas. La adquisición, como primer paso, se produce cuando, por ejemplo, se aprende una asociación entre un contexto y un estímulo. Después está la consolidación, que puede durar desde minutos a días, y en este paso la información se cambia de un estado lábil a un estado más permanente, y por último la evocación; en esta fase se recupera la información almacenada para su utilización (Abel y Lattal, 2001).

Sin embargo, a lo largo de los años, más allá de caracterizar a la memoria como un evento plural, se le ha clasificado por el tipo de información, dividiéndola en memoria declarativa y memoria no declarativa (también conocida como de procedimiento). La memoria declarativa se refiere a la capacidad de recuerdo consciente de hechos y eventos, este tipo de memoria se deteriora en la amnesia, y es compatible con la codificación de recuerdos en términos de relaciones entre hechos y eventos. Los contenidos almacenados son flexibles y se dice que esta memoria declarativa es de tipo representacional, lo cual ayuda en el modelado del mundo exterior, mientras que la de procedimiento es aquella que se adquiere gradualmente a través de la práctica, como escribir, conducir, etc. (Prado-Alcalá, 1998; Squire, 2004).

Otra clasificación de la memoria hace referencia a su duración y la divide en memoria de corto plazo (MCP), la cual es lábil y se mantiene por poco tiempo (minutos a horas), y memoria de largo plazo (MLP) que es estable y perdura en el tiempo (días, meses, años). El paso de esta MCP a MLP se define como consolidación, como ya se mencionó antes (Figura 1) (Dudai, 2004).

Se ha propuesto que la consolidación de la memoria de largo plazo depende del tiempo, y que las etapas de corto plazo y de largo plazo no están secuencialmente vinculadas. La evidencia de que algunas drogas pueden bloquear selectivamente la

memoria de corto plazo o la memoria de largo plazo sugiere que las etapas se basan en procesos independientes actuando en paralelo (McGaugh, 2000).

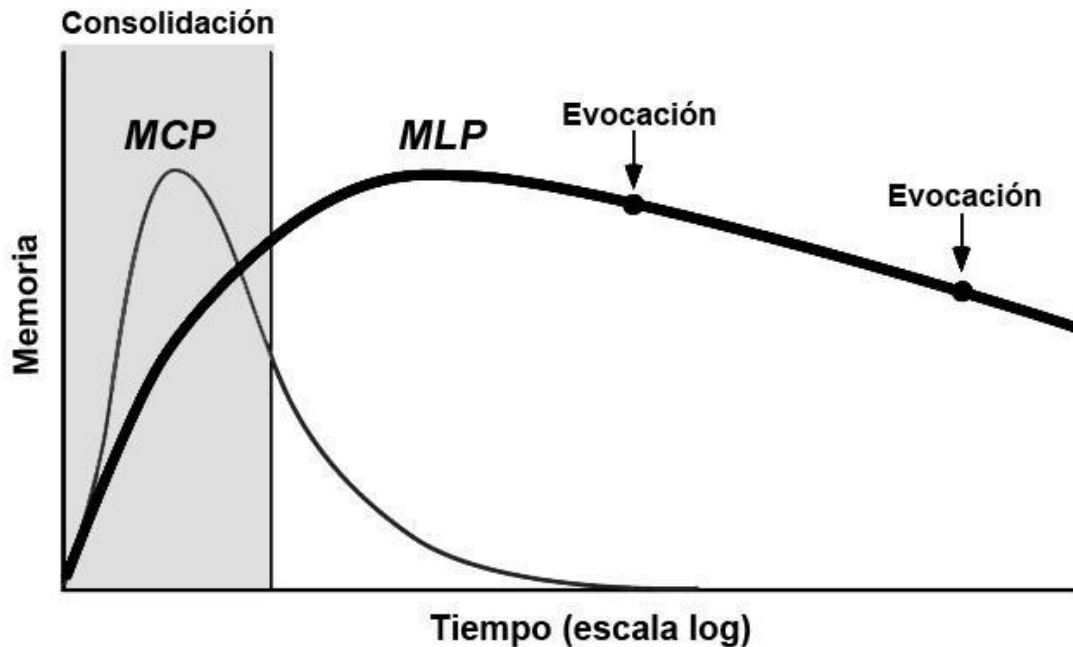


Figura 1. Representación gráfica de la división temporal de la memoria. En la figura se muestran la división entre MCP y MLP, así como los periodos de consolidación y evocación (Modificado de Dudai, 2004).

2.2 Teoría de la consolidación

Una de las características del almacenamiento de la memoria es que la información recién aprendida es sensible a la interferencia con la actividad cerebral. Este estado lábil o periodo de consolidación puede durar horas o incluso días. El hecho de que la memoria pueda ser facilitada o deteriorada durante este periodo lábil, sugiere que este estado pudo haber evolucionado como una manera de permitir que nuevas experiencias puedan ser integradas a la memoria (Abely Lattal, 2001). La evidencia de este proceso se basa en numerosos estudios que muestran que algunos tratamientos, tales como el de choques electroconvulsivos, producen amnesia cuando se administran poco después de una experiencia de aprendizaje, pero el mismo tratamiento aplicado varias horas más tarde no producen ese efecto

(Duncan, 1949). El punto de vista dominante acerca de la conversión de MCP a MLP propone que ésta depende de la síntesis de nuevo ácido ribonucleico (ARN) y de proteínas, las cuales al ser sintetizadas producen alteraciones temporales en la transmisión sináptica, así como modificaciones persistentes en la arquitectura sináptica (Davis y Squire, 1984). Estos procesos se enmarcan en la llamada teoría de la consolidación celular (Debiec et al., 2002).

2.3 Síntesis de proteínas

Katz y Halstead (1950) plantearon la idea de que las proteínas neuronales podrían jugar un papel importante en el almacenamiento de la información aprendida. Propusieron que la síntesis de nuevas proteínas produciría cambios en la citoarquitectura cerebral, tales como la producción y crecimiento de dendritas y espinas dendríticas, así como de ramificaciones axónicas, que podrían mejorar la comunicación interneuronal. Flexner y colaboradores (1961), demostraron que los inhibidores de la síntesis de proteínas (ISP) impiden la consolidación de la memoria. Este hallazgo ha sido confirmado en un gran número de grupos de investigación que han demostrado que la administración de inhibidores de la síntesis proteínica y del ARNm en diferentes estructuras del SNC implicadas en la estabilización de la memoria, genera un efecto amnésico de la información recientemente adquirida (McGaugh, 1966; Squire y Barondes, 1970; Davis y Squire, 1984; Pedreira, 1996; Kandel, 2001; Barrientos, 2002; Igaz et al., 2002; Dudai, 2002; Cammarota et al., 2003; Da Silva et al., 2008; Nader y Hardt, 2009). Estos resultados experimentales han reforzado la teoría de que la síntesis de proteínas de *novo* es necesaria para la consolidación de la memoria (Prado-Alcalá, 1998).

La síntesis de proteínas requiere de dos pasos sucesivos: la transcripción, que es el paso donde se forma el ARN mensajero a partir de ADN en el núcleo celular, y la traducción, durante la cual se pasa de ARN mensajero a una proteína, lo que se lleva a cabo por los ribosomas. Se ha podido comprobar que bloquear cualquiera

de estos dos pasos puede llevar a la interrupción de la consolidación de la memoria (Quevedo et al., 1999).

Un número creciente de publicaciones indica que los tratamientos que típicamente producen amnesia, son inefectivos al ser administrados a sujetos que han sido sobreentrenados (que han recibido un alto número de sesiones o de ensayos de entrenamiento) o sobrerreforzados (que han recibido una estimulación aversiva intensa durante el entrenamiento) (Prado-Alcalá et al., 2012). En nuestro laboratorio se ha investigado el efecto protector de ambos procedimientos de entrenamiento y hemos propuesto que en estas condiciones la consolidación de la memoria podría llevarse a cabo a pesar del bloqueo de la transcripción y o de la traducción de proteínas. Como veremos más adelante, esta tesis se realizó para explorar esta posibilidad.

2.4 Inhibidores de la síntesis de proteínas.

Algunos trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que al administrar inhibidores de la síntesis de proteínas (ISP), como la anisomicina (ANI) (Rodríguez-Serrano et al., 2009) a nivel de la traducción, o el 5,6-dicloro-1- β -ribofuranosilbencimidazol (DRB) a nivel de la transcripción (Torres-García, 2012), directamente en el hipocampo dorsal o en la corteza insular, se impide la consolidación de la memoria de un aprendizaje de evitación inhibitoria; sin embargo, al incrementar la intensidad del entrenamiento (sobrerreforzamiento) hay un efecto protector que impide el efecto amnésico producido por dichos tratamientos (Rodríguez-Serrano et al., 2009; Torres-García, 2012). Estos resultados sugieren que en condiciones de sobrerreforzamiento la síntesis de proteínas no es necesaria como mediador de la consolidación en esas estructuras y para la tarea estudiada (Rodríguez-Serrano et al., 2009; Muñoz-Sánchez et al., 2010, Torres-García, 2012), por lo que la teoría de la síntesis de proteínas como piedra angular para la formación de la memoria a largo plazo queda a discusión.

Podemos dividir a los ISP en dos grupos, los que actúan a nivel de la traducción, donde encontramos fármacos como la anisomicina, la cicloheximida o la puromicina, y los que actúan a nivel de la transcripción como la d-actinomicina y el DRB (Cohen y Barondes, 1966; Flexner et al., 1963; Flood et al., 1973).

La anisomicina (3-acetato de 1,4,5-tridesoxi-1,4-imino-5-(p-metoxifenil)-D-xilopentitol) es un antibiótico aislado a partir de *Streptomyces griseolus*, cuyo principal efecto es la inhibición de la síntesis de proteínas, al actuar sobre la péptidiltransferasa en la subunidad 60S del ribosoma impidiendo la elongación del péptido (Barbacid y Vazquez, 1974); a este efecto se le atribuye, en la mayoría de los estudios, la amnesia causada por la aplicación de la ANI. Sin embargo, estudios como el de Canal y colaboradores (2007), han evidenciado que la ANI también provoca una liberación exacerbada de neurotransmisores, como serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) y dopamina (DA) en la amígdala, después de su aplicación intracraneal en esa estructura, seguida de una disminución en la liberación de estos neurotransmisores y de una recuperación de sus niveles basales hasta las 48 h post-inyección (Figura 2). Este grupo de investigación también reportó una liberación exacerbada de NE, epinefrina y acetilcolina en el hipocampo después de una administración de ANI (Qi y Gold, 2009). Por otro lado, la ANI también se ha descrito como un potente inhibidor de la actividad eléctrica en el hipocampo a los 30 minutos después de su microinyección, sin que esto conlleve a la muerte celular (Sharma et al., 2012). Aunque la ANI es un agente que promueve la apoptosis, para que ésta se produzca se necesitan dosis muy altas en repetidas administraciones, en comparación con otros ISP como la cicloheximida (CXM) que causa un efecto amnésico similar al de la ANI, además de producir un efecto tóxico mayor a menores dosis, así como defectos en la motricidad del animal (Flood et al., 1973).

Este conjunto de resultados encontrados con la ANI nos lleva pensar que son varios los mecanismos responsables del efecto amnésico y no solo la inhibición de la síntesis de proteínas, ya que se ha probado que por separado estos efectos pueden interferir con la consolidación de la memoria (Sadowski et al., 2011).

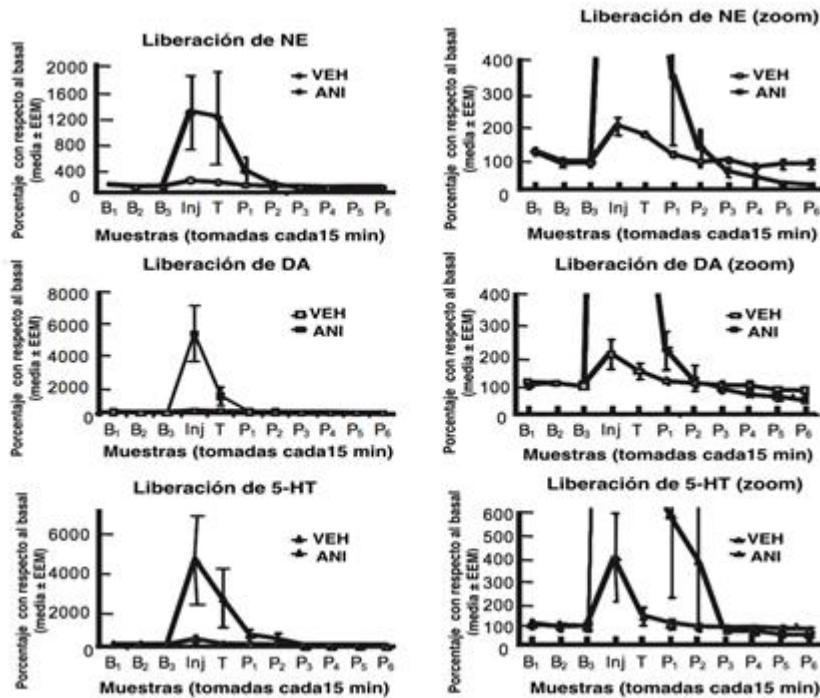


Figura 2. Gráficas de cuantificación por HPLC de liberación de neurotransmisores en la amígdala basolateral después de la aplicación de anisomicina (ANI). El eje de las ordenadas corresponde al porcentaje de liberación de norepinefrina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5-HT), mientras que el de las abscisas corresponde a las muestras tomadas cada 15 minutos: línea basal (B₁, B₂, B₃); post-inyección (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅, P₆); el momento de la inyección de ANI o VEH (Inj). Las gráficas del lado derecho corresponden a un acercamiento de la parte final de la parte final de las gráficas de la izquierda (modificada de Canal et al., 2007).

2.5 Papel de la corteza prefrontal prelámbica en la memoria

La corteza prefrontal (CPF) en los mamíferos está definida como el área cortical que recibe proyecciones del núcleo talámico medial dorsal y abarca una gran proporción del lóbulo frontal de la corteza. Desde el punto de vista evolutivo, la CPF se encuentra en expansión, ya que conforme ascendemos en la escala filogenética posee una mayor diferenciación citoarquitectónica con respecto a otras áreas corticales. Esta área recibe aferencias dopaminérgicas del área ventral tegmental y de la sustancia nigra, así como una importante entrada colinérgica proveniente del núcleo magnocelular (Van Eden y Uylings, 1985).

En los primates la CPF abarca las áreas 8-13, 24, 32, 46 y 47 del mapa citoarquitectónico de Brodmann, y se ha dividido en dos áreas: la orbito medial, implicada en el procesamiento emocional y el área dorsolateral responsable de la organización temporal del comportamiento y el razonamiento (Puig et al., 2004). En roedores la CPF puede ser dividida en medial, orbital y en parte lateral; a su vez, la corteza prefrontal medial (mCPF) puede subdividirse en área anterior del cíngulo, prelímbica (PL) e infralímbica (IL). La mCPF se ha asociado con diferentes funciones que van desde el control oculomotor, el proceso de atención, la toma de decisiones, la actividad visceral, la memoria de trabajo y el aprendizaje; sin embargo, no ha sido plenamente involucrada en la consolidación de la memoria (Cullen, 2015; Euston, 2012). Trabajos como el de Vertes (2004), señalan que por el tipo de aferencias y eferencias encontradas en las zonas PL o IL de la CPF en roedores, existe homología con las áreas de la CPF de primates. La zona PL muestra similitud con el área dorsolateral en la CPF de primates y por lo tanto se infiere una participación similar en las funciones limbo-cognitivas, mientras que la zona IL tiene proyecciones parecidas a la del área orbitomedial en primates (Puig et al., 2004; Vertes, 2004).

El área más dorsal de la mCPF, que incluye el cíngulo y el área agranular, ha sido implicada en conductas motoras, y también interviene en la formación temprana de la memoria del condicionamiento de miedo contextual (Cullen et al., 2015). Por otro lado, las áreas más ventrales, como las cortezas prelímbica e infralímbica, se asocian a procesos emocionales, cognoscitivos y mnemónicos, así como a la modulación de la codificación de la memoria al miedo a través de la transmisión dopaminérgica; además de ser necesarias para la extinción de este tipo de memoria (Zhang et al., 2011). De lo anterior se desprende que la región PL de la mCPF de roedores se ve implicada en el aprendizaje de tipo aversivo y en su evocación (Gourley y Taylor, 2016), pero como se mencionó anteriormente, su participación en la consolidación de la memoria no ha sido plenamente comprobada. Recientemente el trabajo de Canto de Souza y Mattioli (2016), ha sugerido fuertemente la participación de la mCPF en la consolidación de la memoria, ya que

encuentran un efecto amnésico causado por la aplicación de un ISP en esta región (Canto de Souza y Mattioli, 2016).

Es importante señalar que dentro las estructuras más relevantes con conexiones aferentes y eferentes a la mCPF, está la amígdala, la cual es un área esencial para el aprendizaje aversivo, así como para la formación y expresión de recuerdos (Euston et al., 2012; McGaugh, 2015); la mCPF también se conecta con el hipocampo, el cual ha sido relacionado con la memoria de eventos asociados con el miedo y se ha demostrado que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas en estas áreas, impide la consolidación de la memoria (Euston et al, 2012; Quevedo et al., 1999).

3.0 Justificación

El presente trabajo investigará si la corteza prefrontal prelímbica es necesaria para la consolidación de la memoria en condiciones de reforzamiento normal e incrementado (sobrerreforzamiento). Esto debido a que se ha visto implicada en los procesos aprendizaje y memoria de tipo aversivo, pero no se ha descrito nada con respecto a la consolidación de aprendizajes mediados por entrenamiento intenso (sobrerreforzamiento).

4.0 Hipótesis

A. La consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria mediada por un sobrerreforzamiento moderado se verá deteriorada por la administración de un agente amnésico (anisomicina) en la corteza prefrontal prelímbica, este efecto no será debido a interferencia en el aprendizaje de la tarea ni a efecto de dependencia de estado.

B. La consolidación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria en condiciones de sobrerreforzamiento, no se verá deteriorada por la administración de un agente amnésico (anisomicina) en la corteza prefrontal prelímbica.

A lo largo de esta tesis emplearemos indistintamente las denominaciones “entrenamiento intenso”, “entrenamiento incrementado”, “sobrentrenamiento” y “sobrerreforzamiento” para referirnos al tipo de aprendizaje que protege a la memoria contra tratamientos amnésicos, ya que así han sido utilizados en la literatura en este campo.

5.0 Objetivo general

Determinar sí el sobrerreforzamiento protege a la memoria contra el efecto amnésico causado por la aplicación de un inhibidor de la traducción de proteínas en la corteza prefrontal prelámbica.

5.1 Objetivos Particulares

A. Estudiar los efectos de la microinyección de anisomicina en la corteza prelámbica sobre la consolidación de la memoria del aprendizaje en la tarea de evitación inhibitoria en condiciones de bajo reforzamiento.

B. Estudiar los efectos de la microinyección de anisomicina en la corteza prelámbica sobre la consolidación de la memoria del aprendizaje sobrerreforzado de evitación inhibitoria.

C. Estudiar los efectos de la microinyección de la anisomicina en la corteza prelámbica previo al entrenamiento y sus posibles consecuencias sobre la etapa de aprendizaje de la tarea, así como determinar si se produce o no un efecto de dependencia de estado en un aprendizaje de intensidad moderada en la tarea de evitación inhibitoria.

6.0 Método

El protocolo experimental de la presente tesis fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio); y a las normas estipuladas en la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011)*.

6.1 Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, macho, procedentes del Bioterio del Instituto de Neurobiología. Al inicio de los experimentos las ratas pesaron entre 250 y 300 g y se mantuvieron alojadas en cajas individuales con acceso libre a comida y agua, con un ciclo de 12 h/12 h de luz-oscuridad (iniciándose a las 7:00 am). Todas las ratas fueron mantenidas por lo menos una semana en el bioterio del laboratorio antes de cualquier manipulación experimental.

6.2 Cirugía estereotáxica

Se administró pentobarbital sódico intraperitonealmente, con una dosis de 50 mg/kg, combinada con atropina (0.4 mg/kg); las ratas fueron colocadas en un aparato estereotáxico y se les implantaron, bilateralmente, cánulas de acero inoxidable (calibre 30) de 10 mm de longitud en la corteza prelímbica, siguiendo las coordenadas, con respecto a bregma: A-P = +3.0, D-V = -3.2, M-L = ± 0.7 , tomadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (2007), anclándose al hueso parietal con un tornillo de relojero y con acrílico dental.

6.3 Manipulación

Este procedimiento se realizó durante los tres días anteriores a la microinyección. Las ratas fueron llevadas a la sala de manipulación donde fueron pesadas y manejadas por el experimentador durante 3 min. Durante el tercer día de manipulación se introdujo un inyector falso en cada cánula para verificar que no estuviesen obstruidas.

6.4 Aparatos

La cámara de evitación inhibitoria (EI), está compuesta por dos compartimientos del mismo tamaño (30 cm x 30 cm x 30 cm cada uno) separados por una puerta tipo guillotina. Uno de los compartimientos, el de “seguridad”, está iluminado por un foco de 10 watts colocado en la tapadera del compartimiento y el piso está conformado por una rejilla de varillas de acero inoxidable (de 6mm de diámetro, separadas por 9 mm entre sí). El otro compartimiento, “de castigo”, es relativamente oscuro y sus paredes laterales de acero inoxidable tienen forma de V, las cuales llegan al piso del compartimiento, estando separadas en este lugar por una distancia de 1.5 cm (justo a la mitad del piso) (Figura 3). Estas láminas pueden electrificarse con un estimulador de pulsos cuadrados (Grass modelo No. S-48) acoplado a una unidad de corriente constante (Grass modelo No.CCU-1A). La duración de la aplicación de los estímulos, las latencias de entrada, escape y de retención fueron medidas automáticamente con ayuda de una computadora, la cual permite la presentación de estímulos y el registro de las latencias de adquisición, escape y retención. La cámara de evitación inhibitoria está ubicada en un cuarto sonoamortiguado.

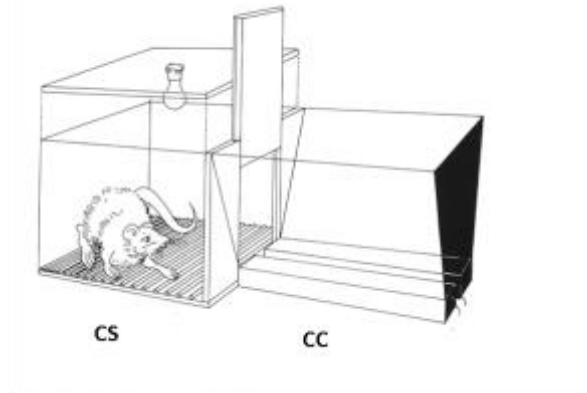


Figura 3. Cámara de evitación inhibitoria. El compartimiento de seguridad (CS) está iluminado, y el de castigo (CC) es oscuro; ambos están separados por una puerta tipo deslizable.

6.5 Evitación inhibitoria (EI)

Entrenamiento. La rata es colocada en el compartimiento de seguridad, y 10 s después se abre la compuerta; una vez que el animal pasa al compartimiento de castigo se cierra la compuerta y se administra un choque eléctrico durante 10 s. Transcurridos 5 segundos después del inicio del choque se abre la compuerta, permitiendo a los sujetos escapar al compartimiento de seguridad en donde permanecen por 30 s antes de ser regresados a su caja-habitación. Se registra el tiempo transcurrido entre la colocación de la rata en el compartimiento de seguridad y el momento en el que ingresa al compartimiento de castigo (latencia de entrada), así como el tiempo en que tarda en regresar del compartimiento de castigo al de seguridad durante la administración del choque (latencia de escape).

Prueba de retención. Dependiendo del experimento particular, la medición de la retención se realizó 30 min o 48 h después del entrenamiento, para estudiar las memorias de corto y largo plazo, respectivamente. Las condiciones de la sesión de prueba fueron las descritas para la sesión de entrenamiento, con la variación de que no se administró el choque eléctrico y la sesión se dio por terminada una vez que la rata hubo pasado al compartimiento de castigo o hubieron transcurrido 600 s. Se

registró la latencia entre la apertura de la puerta y el momento en el que la rata colocó las cuatro extremidades en el compartimiento de castigo (latencia de retención).

6.6 Tratamientos

La microinyección de anisomicina se realizó utilizando una bomba de infusión lenta (World Precision Instruments Inc., modelo sp200i, EUA), acoplada a una microjeringa Hamilton de 10 μ L, que estaba unida por un tubo de polietileno a un inyector de 11mm de longitud, fabricado con una aguja hipodérmica de acero inoxidable de calibre 30. A través de las cánulas se realizó la microinyección simultánea de un volumen de 0.5 μ L, administrado en 1 min, con una dosis de anisomicina de 31.25 μ g disuelta en 0.5 μ L solución salina isotónica (vehículo); en el caso de los sujetos control se aplicó el mismo volumen de vehículo y los inyectores se dejaron dentro de las cánulas durante un minuto adicional para permitir una mejor difusión de las soluciones. En experimentos realizados en nuestro laboratorio hemos encontrado que en la tarea de El la administración de anisomicina, inmediatamente después del entrenamiento, produce amnesia con dosis de 15.5, 31.25, 62.5 y 100 μ g (Huchín-Ramírez, 2007; Muñoz-Sánchez, 2010; Juárez et al., 2011). En consecuencia, en la presente tesis se administró una de las dosis intermedias de este inhibidor.

6.7 Análisis histológico

Las ratas fueron perfundidas con solución salina isotónica, a través del ventrículo izquierdo del corazón, seguida de una solución de formaldehído al 10%, para la posterior extracción del cerebro. Después se procedió a realizar cortes coronales de 50 μ m de espesor, que fueron teñidos con la tinción de Nissl, con el fin de revisar si las cánulas estuvieron implantadas en el sitio adecuado, como se muestra en la Figura 4.

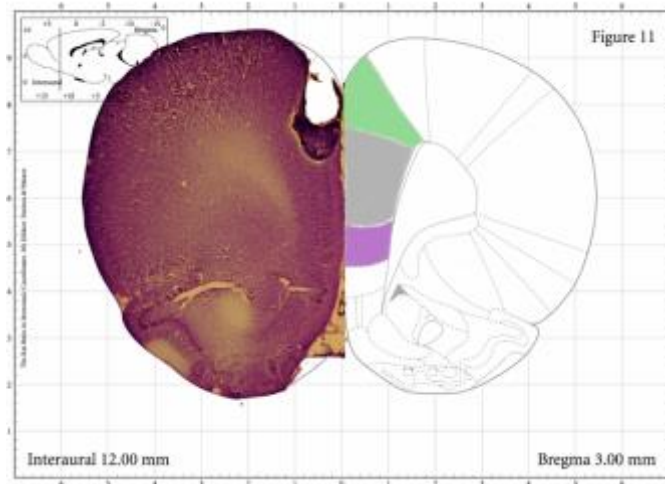


Figura 4. Corte representativo en el que se puede observar la trayectoria de una cánula. A la izquierda, fotografía de un corte coronal de 50 µm con tinción de Nissl, en la derecha se presenta un dibujo representativo de la región en la que se encuentra la corteza medial prefrontal. En color verde, el área del cíngulo; en color gris la corteza prelímbica y en morado, la corteza infralímbica (Modificado de Paxinos y Watson; 2007).

6.8 Análisis estadístico

Debido al punto de corte arbitrario de la latencia de retención (600 s), los datos derivados de las pruebas de retención no se distribuyeron de forma normal. Por esta razón se utilizó estadística no paramétrica. Se realizaron análisis independientes para las latencias de adquisición, escape y retención, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis; cuando se encontraron diferencias significativas entre los grupos, se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar la ejecución entre pares de grupos ($p < 0.05$ considerado significativo). Los datos se presentan como medianas \pm sus rangos intercuartiles.

7.0 Experimento 1. Curva de intensidad

En este experimento probamos tres intensidades de choque (1.0 mA, 2.0 mA y 3.0 mA), con el fin de verificar si un sobrerreforzamiento (con los choques altos) puede

proteger del efecto amnésico descrito para ANI. Se emplearon grupos independientes de ratas para cada intensidad de choque y se asignaron aleatoriamente a cada condición tanto de choque como para formar los grupos control y de ANI. El desarrollo temporal del experimento se muestra en la Figura 5 y el número total de ratas utilizadas en cada grupo se muestran en la Tabla 1.

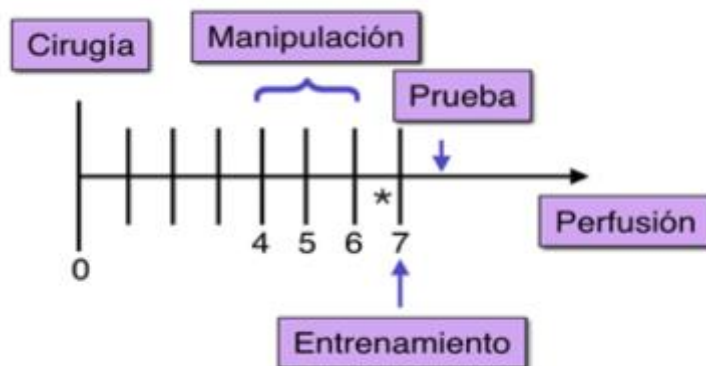


Figura 5. Desarrollo temporal a lo largo de los días del experimento 1 de la curva de intensidad en el que se administró ANI o vehículo 30 minutos antes del entrenamiento (*). La prueba de retención se realizó 48 h después del entrenamiento.

Tabla 1. Curva de intensidad

Intensidad de choque	Control	ANI
1 mA	n = 9	n = 9
2 mA	n = 8	n = 8
3 mA	n = 9	n = 9

Tabla 1. Diseño experimental de grupos independientes. Control: grupos con administración de solución salina isotónica; ANI: grupos con administración de anisomicina en una dosis de 31.25 µg/0.5µl; n, tamaño de la muestra.

7.1 Resultados del experimento 1

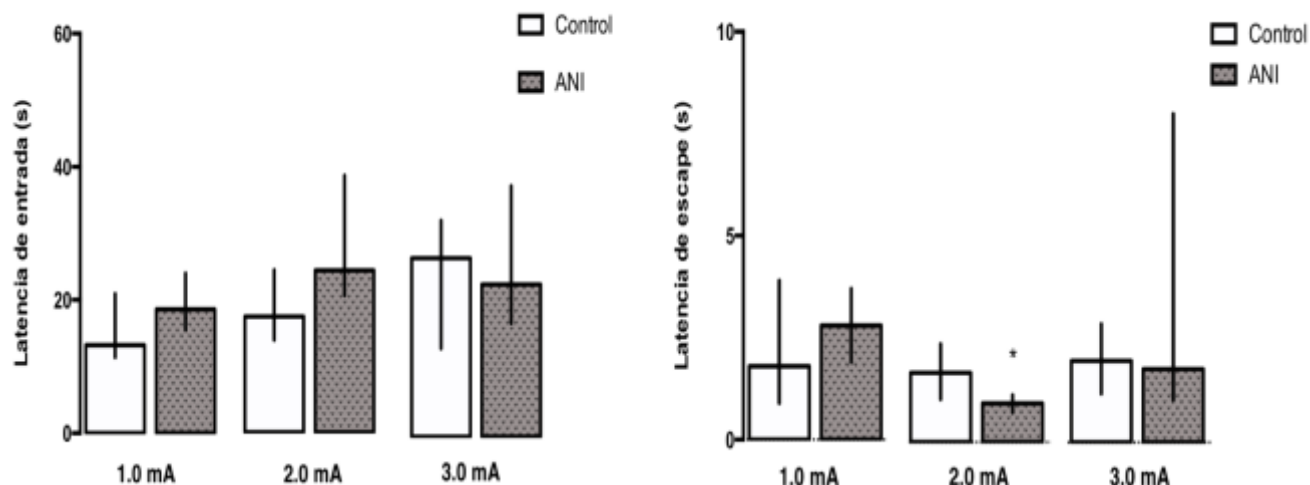


Figura 6. Latencias de entrada y escape (medianas y rango intercuartilar) de los grupos entrenados con 1.0, 2.0 o 3.0 mA. En las barras claras se representan la ejecución de los grupos control para cada intensidad de choque y en las barras oscuras la de los grupos tratados con ANI para cada intensidad de choque. En la gráfica de la izquierda se encuentran las latencias de entrada y en la gráfica de la derecha se encuentran las de escape para las diferentes intensidades de choque. * $p < 0.05$ con respecto a su control.

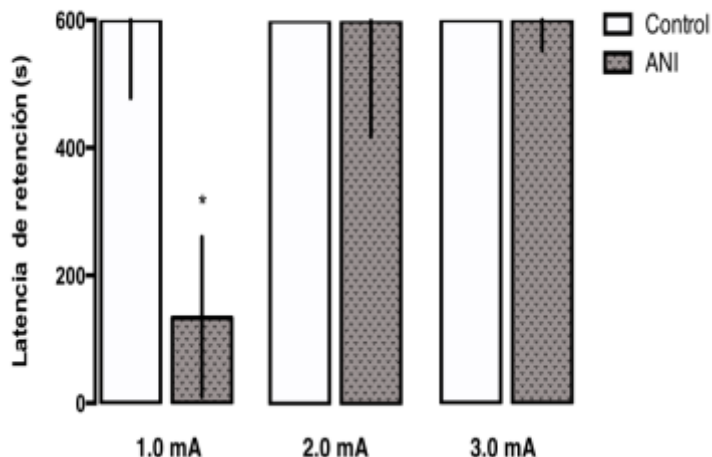


Figura 7. Latencias de retención (medianas y rango intercuartilar) de los grupos entrenados con 1.0, 2.0 o 3.0 mA. Las barras claras representan la ejecución de los grupos control para cada intensidad de choque y las barras oscuras la de los grupos tratados con ANI para cada intensidad de choque. Solamente se encontró diferencia significativa, entre el grupo tratado con anisomicina y su grupo control cuando fueron entrenados con 1.0 mA. * $P < 0.0001$.

Los resultados de este experimento mostraron que todos los grupos ejecutaron la respuesta de entrada al compartimento oscuro con la misma latencia; asimismo, los grupos que fueron entrenados con 1.0 y 3.0 mA tuvieron la misma latencia de escape. El grupo entrenado con 2.0 mA y microinyectado con ANI mostró una latencia de escape menor que su grupo control.

El resultado más importante de este experimento fue que, como se predijo, la administración de ANI en la corteza prelímbica produjo una deficiencia significativa en la retención de la tarea entrenada con 1.0 mA, mientras que este inhibidor no produjo deterioro alguno en la retención de los grupos entrenados sobrerreforzados con 2.0 o 3.0 mA.

8.0 Experimento 2. Memoria de corto plazo

Para este experimento se decidió emplear solo la intensidad de choque de 1mA, con el fin de determinar si el efecto amnésico causado por la ANI fue debido a la interferencia durante el periodo de la consolidación, o si se debió a deficiencias en el aprendizaje. Se emplearon grupos independientes de ratas que fueron asignadas aleatoriamente para formar los grupos control y ANI; en la Figura 8 se muestra el desarrollo temporal, mientras que en Tabla 2 encontramos el número de animales de cada grupo para este experimento.

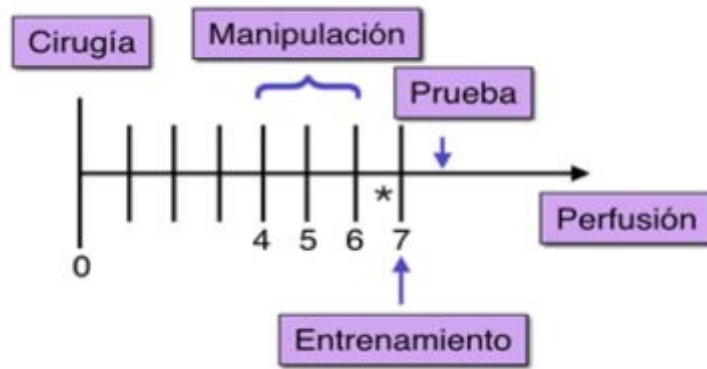


Figura 8. Desarrollo temporal a lo largo de los días del experimento de memoria a corto plazo. Donde se administró ANI o vehículo 30 minutos antes del entrenamiento (*) y se probó la retención 30 min después del entrenamiento.

Tabla 2. Memoria de corto plazo

Intensidad de choque	Control	ANI
1 mA	n = 9	n = 9

Tabla 2. Diseño experimental de grupos independientes. Control: grupo solución tratado con salina isotónica; ANI: grupo con administración de anisomicina (31.25 $\mu\text{g}/0.5\mu\text{l}$). La intensidad de choque en el entrenamiento de EI fue de 1.0 mA.

8.1 Resultados del experimento 2

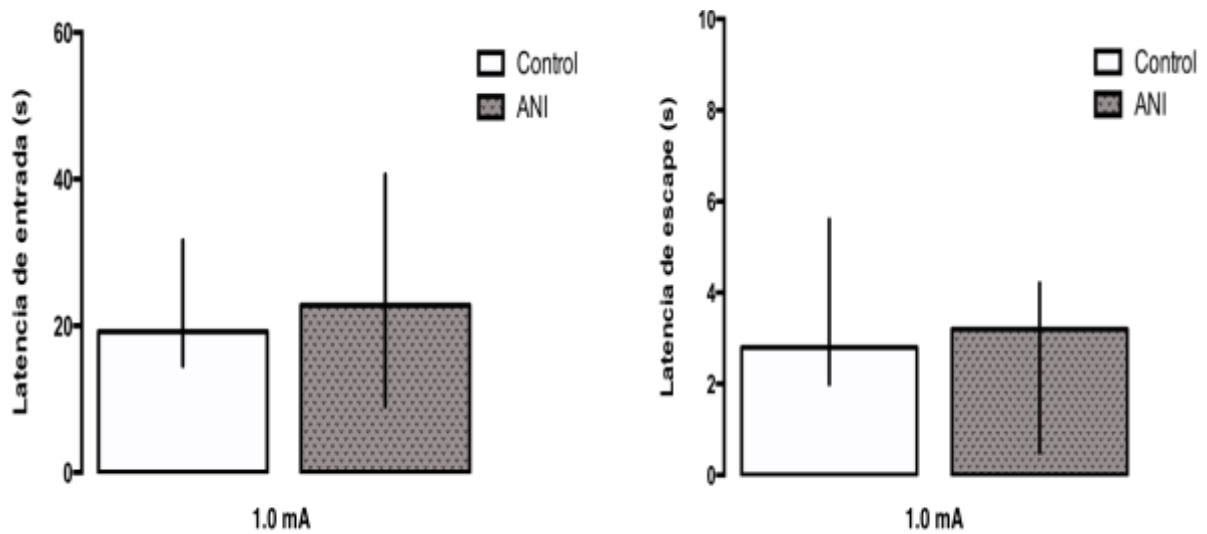


Figura 9. Latencias de entrada y escape (medianas y rango intercuartilar) de los grupos a los que se le midió la memoria de corto plazo. Las barras claras representan la ejecución del grupo control y las barras oscuras la del grupo tratado con ANI. En la gráfica de la izquierda se encuentran las latencias de entrada y en la gráfica de la derecha se encuentran las de escape.

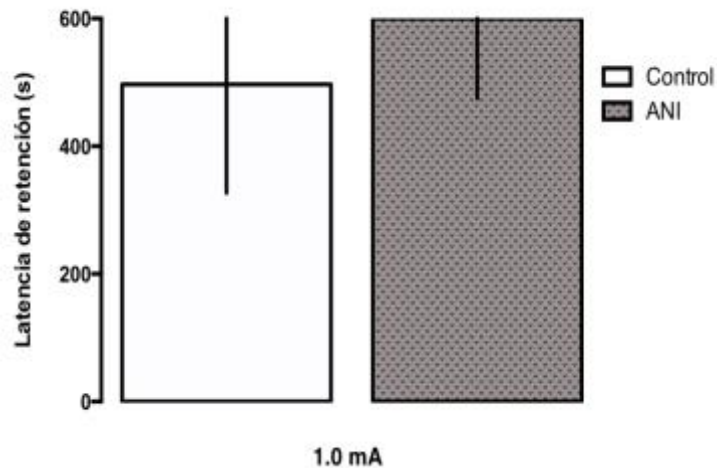


Figura 10. Latencia de retención (mediana y rango intercuartilar) durante la medición de la memoria de corto plazo 30 min después del entrenamiento. En la barra clara se representa la ejecución del grupo control y en la barra oscura la ejecución del grupo tratado con ANI. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Los resultados de este experimento mostraron que ambos grupos ejecutaron la respuesta de entrada al compartimento oscuro con la misma latencia; asimismo, ambos tuvieron la misma latencia de escape. La administración de ANI no produjo deficiencias en la memoria de corto plazo, ya que su ejecución no difirió significativamente de la del grupo tratado con el vehículo.

9.0 Experimento 3. Dependencia de estado

Ya que las ratas entrenadas con intensidades (2.0 y 3.0 mA) las ratas no presentaron el efecto amnésico típico de la ANI, en este experimento solo se evaluó con la intensidad de choque de 1.0 mA para determinar si el efecto amnésico que se produjo por la ANI en las ratas entrenadas con 1.0 mA se debió a un aprendizaje dependiente de estado. En otras palabras, se verificó si los sujetos experimentales no asociaran el estado farmacológico inducido por la ANI con la situación del aprendizaje realizado, y por lo tanto no fueran capaces de evocar correctamente la respuesta condicionada 48 h después, cuando el efecto farmacológico hubiera desaparecido. Para descartar el posible efecto de dependencia de estado se administró anisomicina en dos ocasiones a cada sujeto, 30 min antes del entrenamiento y 30 min antes de la prueba de retención; de esta manera el estado farmacológico del cerebro fue el mismo en ambas condiciones. Se emplearon grupos independientes para cada intensidad de choque y se asignaron aleatoriamente para formar los grupos control y ANI. En la Figura 11 se muestra el desarrollo temporal de este experimento y en la Tabla 3 el número de ratas asignadas por grupo para este experimento.

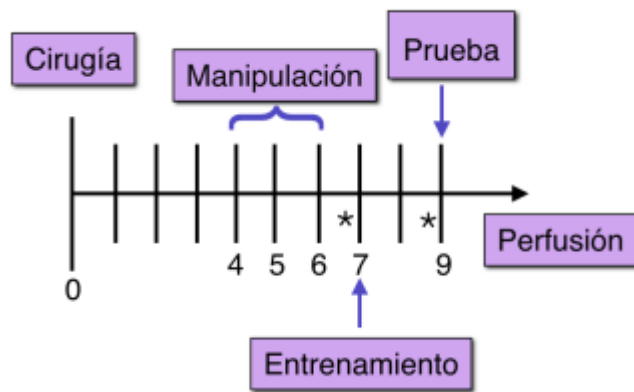


Figura 11. Desarrollo temporal a lo largo de los días para este experimento de dependencia de estado; se administró ANI o vehículo dos veces a cada sujeto: 30 min antes del entrenamiento y 30 antes de la prueba (*), y se midió la memoria 48 horas después del entrenamiento.

Tabla 3. Dependencia de estado

Intensidad de choque	Control	ANI
1 mA	n = 8	n = 8

Tabla 3. Diseño experimental de grupos independientes Control: grupo con administración de solución salina isotónica, ANI: grupo con administración de anisomicina con una dosis de 31.25 µg/0.5µl. La intensidad de choque en el entrenamiento de El fue de 1.0 mA. n, tamaño de la muestra.

9.1 Resultados experimento 3

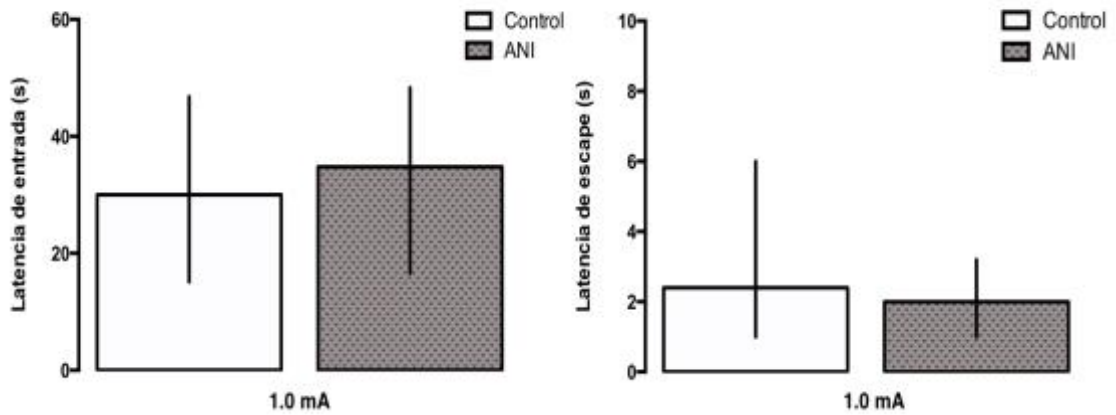


Figura 12. Latencias de entrada y escape de las ratas (mediana y rango intercuartil) en las que se estudió la posible dependencia de estado. Las barras claras representan la ejecución del grupo control y las barras oscuras la del grupo tratado con ANI. En la gráfica de la izquierda se encuentran se encuentran las latencias de entrada y en la gráfica de la derecha se encuentran las de escape.

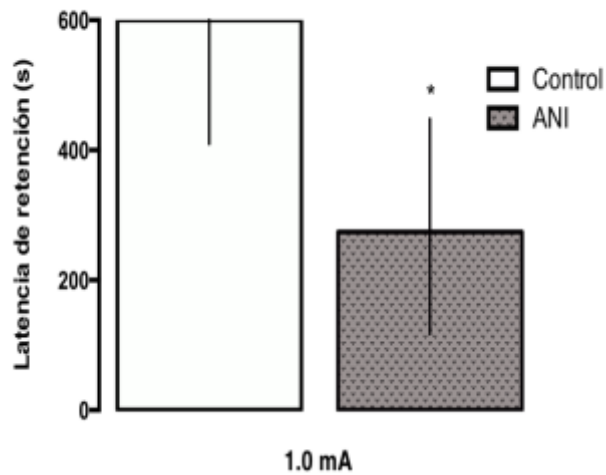


Figura 13. Latencias de retención de las ratas (mediana y rango intercuartil) en las que se estudió la posible dependencia de estado. La barra clara representa la ejecución del grupo control y la barra oscura la del grupo tratado con ANI. Se encontró diferencia significativa entre los grupos. * $P < 0.05$.

Los resultados de este experimento mostraron que ambos grupos ejecutaron la respuesta de entrada al compartimento oscuro con la misma latencia; asimismo, ambos tuvieron la misma latencia de escape. La administración de ANI tanto antes del entrenamiento como antes de la prueba de retención produjo deficiencias en la memoria de largo plazo, ya que la ejecución del grupo tratado con ANI fue significativamente menor que la del grupo tratado con el vehículo.

10.0 Discusión

El hallazgo principal de esta tesis fue que el entrenamiento incrementado o sobrerreforzado impidió que la administración de un agente amnésico potente en la CxPrL produjera amnesia que se ha reportado cuando el entrenamiento se lleva a cabo con intensidades moderadas de estimulación aversiva.

Es muy importante dejar claramente establecida la definición de entrenamiento incrementado, al que también se le ha denominado “entrenamiento intenso”, “sobrentrenamiento” y “sobrerreforzamiento” para referirnos al tipo de aprendizaje que protege a la memoria contra tratamientos amnésicos, ya que así han sido utilizados en la literatura en este campo. Este tipo de entrenamiento se establece a través de un mayor número de ensayos o de sesiones de entrenamiento o, en el caso de aprendizajes aversivos, por la aplicación de niveles relativamente altos de estimulación aversiva. Lo que define al aprendizaje incrementado es la resistencia a la extinción, de tal manera que los sujetos sometidos a este tipo de aprendizaje tardan un tiempo significativamente mayor para extinguir la respuesta condicionada que aquellos sujetos que fueron entrenados con un estímulo de menor intensidad.

En las condiciones experimentales de nuestro laboratorio hemos demostrado repetidas veces que los choques de mayor intensidad, como los utilizados en esta tesis, producen mayor resistencia a la extinción (Prado-Alcalá et al., 1994; Garín-Aguilar et al., 2012; Bello-Medina et al., 2016; González-Franco et al., 2017).

En primera instancia se realizó el experimento denominado curva de intensidad; éste tuvo la finalidad de determinar, en primer lugar, si en nuestras condiciones experimentales, la administración de ANI en la corteza prelímbica produce amnesia cuando el entrenamiento se lleva a cabo con una intensidad moderada de choque eléctrico, es decir, si impide la consolidación de la memoria. En segundo lugar, y de manera más importante, si el entrenamiento intenso, es decir, sobrerreforzado, impide el efecto amnésico de la ANI.

En este experimento se encontró una baja latencia de retención en las ratas microinyectadas con ANI en el área PL de la mCFP y entrenadas con 1.0 mA presentaron una baja latencia de retención en comparación con su grupo control (Figura 7), lo que nos indica un deterioro de la memoria, que coincide con lo reportado en trabajos anteriores, donde se señala que al administrar ANI en el CPF en su parte medial, provoca un efecto amnésico en diferentes tipos de tareas, tanto en aprendizajes de tipo aversivo, como el de EI o en los de tipo espacial, como el laberinto radial (Canto de Souza y Mattioli, 2016; Santini et al., 2004; Touzani et al., 2007). Estos resultados apoyan la teoría propuesta por Katz y Halstead en 1950, sobre una dependencia de síntesis de proteínas de *novo* en la consolidación de la memoria (Barbacid y Vazquez, 1974; Flexner et al., 1963).

Sin embargo, es importante aclarar que este efecto de la ANI no puede ser atribuido solamente a inhibición de la síntesis de proteínas, debido a los efectos secundarios de producidos por este fármaco, como lo es la liberación exacerbada de neurotransmisores como la serotonina (5-HT), norepinefrina (NE), dopamina (DA) y acetilcolina (ACh), que se ha observado en el hipocampo y en la amígdala. (Canal et al., 2007; Qi y Gold, 2009), así como el abatimiento de la actividad eléctrica del hipocampo. Así pues, no podemos descartar que dichos efectos secundarios también pudieran suceder en la CPF.

Estos neurotransmisores han sido implicados en las diferentes etapas del aprendizaje y la memoria. En el caso de la DA tanto en la mCPF como en el hipocampo, se ha implicado en los aprendizajes de tipo aversivo, mediante una señalización mediada por receptores a DA de tipo D1 y D5; a este tipo de señalización se le ha relacionado

con procesos cognitivo-emocionales, así como motivacionales. A esta evidencia se le suma, que al aplicar un antagonista a DA (SCH23390) en el hipocampo, doce horas después de llevar a cabo un entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, se produce una baja retención de la tarea al evaluar memoria de largo plazo, por lo que podríamos inferir que para la consolidación de este tipo de tareas es necesaria una señalización mediada por DA, la cual no podría llevarse de manera normal en los sujetos experimentales estudiados en esta tesis, debido a que después de la aplicación de la ANI, los niveles de este neurotransmisor pudieran estar alterados (Furini et al., 2014 e Izquierdo et al., 2016).

Se ha descrito que la ACh en la CPF, forma parte importante de la regulación que ocurre en el aprendizaje y la extinción de las tareas de tipo aversivo; esto se atribuye principalmente a las aferencias y eferencias que esta estructura tiene con la amígdala. También se ha observado que, al incrementar la concentración de ACh en la neocorteza, se produce un aumento en la actividad eléctrica de las neuronas piramidales de esta estructura, lo cual puede llevar a interferencias en el proceso de consolidación de la memoria (Wilson y Fadel, 2017).

Por otra parte, trabajos donde se ha microinyectado NE en la amígdala, se ha observado un deterioro en la retención de la tarea de evitación inhibitoria, demostrándose también que la depleción de este neurotransmisor podría provocar un efecto independientemente y similar al producido por la inhibición de la síntesis de proteínas inducida por la ANI (Canal et al., 2007).

Por su parte, la 5-HT resulta interesante debido a que en trabajos en los que se induce una depleción selectiva de este neurotransmisor en el hipocampo, se ha encontrado un efecto de facilitación en el aprendizaje en tareas de tipo espacial (Gutiérrez-Guzmán et al., 2017). Sin embargo, contrario a lo anterior, en estudios donde se utilizaron agonistas a receptores de serotonina (5-HT_{1A}/5-HT_{7o}), como el 8-hidroxi-2(di-n-propil-amino)-tetralin (8-OH-DPAT), se observó una interferencia con la consolidación de la memoria (Koenig et al., 2008; Bertrand et al., 2000). Por lo que en el caso de la 5-HT no podemos tener una idea clara acerca de la acción de una

depleción masiva de este neurotransmisor en la CPF, sin tener una evaluación del mismo en esta corteza, para la tarea de EI y en dosis similares a la que se presenta tras la administración de ANI.

Otra perspectiva desde donde podemos abordar el efecto provocado por la depleción de los neurotransmisores sobre la consolidación, es la propuesta por Caroni y colaboradores (2014), que proponen que la liberación de neurotransmisores como la DA, puede funcionar como una coseñal, para llevar a cabo no sólo el inicio y sino también la potenciación de los cambios plásticos que se realizan durante estos procesos, y proponen que es con estos neurotransmisores, al igual que un conjunto de otras señales (entre las que encontramos factores de crecimiento, hormonas, etc.) este proceso podría llevarse correctamente o por completo. En el mismo trabajo este grupo señala que este tipo de eventos como, la liberación de neurotransmisores, podría provocar una inhibición de la síntesis de proteínas, al bloquear la respuesta temprana de los factores de traducción provocando un bloqueo en la cadena de la síntesis de proteínas (Caroni et al., 2014), lo cual podría explicar el efecto amnésico producido por la ANI.

Por otro lado, hay que notar que en esta tesis el efecto amnésico de la ANI no se presentó en las ratas entrenadas con las intensidades de 2.0 y 3.0 mA estimulación aversiva, revelándose así el efecto protector del sobrerreforzamiento contra la interferencia con la consolidación de la memoria que típicamente produce la ANI. Este resultado es congruente con los resultados de trabajos que muestran que el sobrerreforzamiento tiene un efecto protector sobre la consolidación tras la administración de inhibidores a nivel traduccional y transcripcional de proteínas en diferentes estructuras como la amígdala, estriado e hipocampo (Rodríguez-Serrano et al., 2009; Muñoz-Sánchez et al., 2010; Torres-García, 2012). También se ha reportado administración de un choque de 3.0 mA produjo una resistencia a la extinción (aprendizaje incrementado) comparado con la aplicación de un choque de 1.0 o de 2.0 mA en una tarea de EI (Garín-Aguilar et al., 2012; Bello-Medina et al., 2016; González-Franco et al., 2017).

Para explicar este efecto protector del sobrerreforzamiento para la tarea de EI, hay

que tomar en cuenta que esta tarea conlleva un alto contenido emocional como resultado de la activación de estructuras involucradas para la consolidación de la memoria, como la amígdala, que juega un papel primordial en este tipo de aprendizaje. Durante una experiencia altamente emotiva hay liberación de las hormonas adrenales, así como un aumento en la liberación de epinefrina, que induce a su vez la liberación de norepinefrina (NE) en la amígdala basolateral, como consecuencia de la activación de aferencias vagales provenientes del núcleo del tracto solitario. La NE se une a los β -adrenoreceptores y α -1-adrenoreceptores en la postsinapsis, activando la cascada 3',5'- adenosín monofosfato cíclico (cAMP), que a su vez activa una serie de kinasas como la PKA y la MAPK, que promueven la expresión de factores de transcripción, que pueden llevar al aumento de la expresión génica de genes implicados en la plasticidad neuronal (Bacskai et al., 1993; Martin et al., 1997; Roozendaal et al., 2008). Por ejemplo, esta activación noradrenérgica en la amígdala, incrementa la expresión de la proteína Arc en el hipotálamo dorsal, que es una proteína involucrada en la remodelación sináptica (McIntyre et al., 2012). Además, trabajos como el de Quirarte y colaboradores (1998) han demostrado que la liberación de la NE por la amígdala varía directamente con la intensidad del choque administrado.

También se ha visto que este tipo de eventos emotivos, propician la liberación de glucocorticoides que son un tipo de esteroides endógenos, que si bien por si mismos pueden provocar facilitación en el almacén de la memoria, también pueden producir una activación de la vía noradrenérgica en la amígdala (Quirarte et al., 1997). Por lo que una hiperactivación de este sistema al aumentar el estímulo aversivo, podría ser el causante de la resistencia encontrada a los efectos de la ANI. Lo anterior indica que el efecto protector podría estar regulado fuertemente de forma endocrina, lo que podría permitir la activación de los mecanismos mínimos necesarios para la consolidación de la memoria, a partir de modificaciones postraduccionales en proteínas ya existentes o bien a través de mRNA no codificantes, los cuales no se verían afectados por la inhibición a nivel traduccional (Kandel, 2001). Dada su íntima relación con la amígdala, es posible que este tipo de mecanismos también estén involucrados en la CPF como resultado del

aprendizaje de evitación inhibitoria.

Otra manera de explicar los hallazgos discutidos en el presente trabajo, concuerdan con la teoría de un circuito plástico, que puede cambiar su conectividad, dependiendo de la intensidad del aprendizaje. Este modelo indica que cuando la experiencia de aprendizaje es moderada, la participación de un cierto número de estructuras (por ejemplo, el hipocampo, la amígdala, el estriado y la CPF) es necesaria para la formación de la memoria de largo plazo, ya que estarían conectadas, funcionalmente, en serie. El modelo predice que en condiciones de aprendizaje incrementado (sobrerreforzado), estas u otras estructuras cerebrales se conectarían en paralelo, de tal manera que, aunque alguna (o algunas) de ellas fueran inactivadas, la información derivada de la experiencia de aprendizaje alcanzaría un centro integrador hipotético, a través de las estructuras que permanezcan funcionales (Prado-Alcalá, 1995).

Por otra parte, para constatar si el efecto amnésico encontrado en las ratas entrenadas con 1.0 mA se debió a la interferencia con la consolidación y no a problemas durante la etapa de aprendizaje, encontramos que al medir la memoria de corto plazo no se hallaron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con ANI. Este resultado demuestra que el aprendizaje se llevó a cabo de igual manera para ambos grupos apoyando la teoría de que en la memoria de corto plazo no es dependiente de síntesis de proteínas (Dudai, 2004).

Por último nos preguntamos si el efecto amnésico era debido a que la ANI, la cual se administró 30 min antes del entrenamiento, produjo un estado farmacológico que fuera asociado como parte del contexto, es decir, como parte del estímulo condicionado y al no estar presente el día de la prueba, la rata presentara un efecto amnésico, dependiente de estado, producido por una dificultad en la evocación debido a que el contexto en el que se llevó a cabo el aprendizaje (cámara de condicionamiento + estado farmacológico producido, por la anisomicina) no estaba completo en el momento de la realización de la prueba (ausencia del estado farmacológico). Por lo tanto, se realizó la infusión del fármaco dos veces: 30 min antes del entrenamiento y 30 min antes de realizar la prueba, para imitar las

condiciones en las que se encontraba la rata en el día del entrenamiento, y encontramos que se produce el efecto amnésico de la ANI, por lo que concluimos con este experimento que las ratas no presentaron dependencia de estado.

11.0 Conclusión

La aplicación de la anisomicina en la corteza prefrontal en su región prelímbica produjo un efecto amnésico sólo cuando los animales fueron entrenados con intensidades bajas, lo cual podría sugerir que la corteza prefrontal prelímbica está implicada en la consolidación de la memoria de este tipo de aprendizaje, no así en la consolidación de la memoria después del entrenamiento con intensidades altas, es decir después del aprendizaje sobrerreforzado.

Referencias

Abel T y Lattal K. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*. 11(2), 180-187.

Barrientos RM, O'Reilly RC y Rudy J W. (2002). Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behavioural Brain Research*. 134: 299-306.

Barbacid M y Vazquez D. (1974). (3H) anisomycin binding to eukary-otic ribosomes. *Journal of Molecular Biology*. 84, 603–623.

Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, y Tsien RY. (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science*. 260, 222–226.

Bello-Medina PC, Flores G, Quirarte GL, McGaugh JL y Prado-Alcalá RA. (2016). Mushroom spine dynamics in medium spiny neurons of dorsal striatum associated with memory of moderate and intense training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113(42). E6516-E6525.

Bertrand F, Lehmann O, Lazarus C, Jeltsch H y Cassel JC. (2000). Intraseptal infusions of 8-OH-DPAT in the rat impairs water-maze performances: effects on memory or anxiety? *Neuroscience Letters*. 279(1):45-8.

Cammarota M, Bevilaqua LRM, Kerr D, Medina JH e Izquierdo I. (2003). Inhibition of mRNA and Protein Synthesis in the CA1 Region of the Dorsal Hippocampus Blocks Reinstallation of an Extinguished Conditioned Fear Response. *Journal of Neuroscience*. 23: 737–7.

Canal CE, Chang, Q y Gold PE. (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.

Canto de Souza L. y Mattioli R. (2016). The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*. 130, 44–51.

Caroni P, Chowdhury A y Lahr M. (2014). Synapse rearrangements upon learning: from divergent-sparse connectivity to dedicated sub-circuits. *Trends in Neurosciences*. 37(10):604-14.

Cohen, HD y Barondes, SH. (1966). Further studies of learning and memory after intracerebral actinomycin D. *Journal of Neurochemistry*. 13: 207- 211.

Cullen PK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC y Jasnow AM. (2015). Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. *Neurobiology of Learning and Memory*. 124:19-27.

Da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LRM, Medina JH, Izquierdo I y Cammarota M. (2008). Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory. *Hippocampus*. 18: 29–39.

Davis HP y Squire LR. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin*. 96(3), 518-559.

de Haan M y Johnson M H (2014). *The Cognitive Neuroscience of Development*. Agawam Massachusetts: Psychology Press.

Debiec J, LeDoux J y Nader K. (2002). Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. *Neuron*. 36, 527-238.

Dudai Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology* .12: 211-216.

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

Duncan CP. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 42(1), 32-44.

Flexner JB, Flexner LB y Stellar E. (1963). Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science*. 141(3575):57-59.

Flood J F, Rosenzweig M R, Bennett EL y Orme AE. (1973). The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiology & Behavior*. 10(3), 555- 562.

Furini CRG, Myskiw JC, Schmidt BE, Marcondes LA, Izquierdo I. (2014). D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behavioural Brain Research*. 271: 212–217.

Van Eden CG y Uylings HBM. (1985). Cytoarchitectonic Development of the Prefrontal Cortex in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 242: 253-2676.

Euston DR, Gruber AJ y McNaughton BL. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*. 20;76(6):1057-1070.

Garín-Aguilar ME., Díaz-Cintra S, Quirarte, GL, Aguilar-Vázquez A, Medina AC y Prado-Alcalá RA. (2012). Extinction induces pruning of dendritic spines in hippocampal CA1 depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 6:12.

González-Franco DA, Ramírez-Amaya V, Joseph-Bravo P, Prado-Alcalá RA y Quirarte GL. (2017). Differential Arc protein expression in dorsal and ventral striatum after moderate and intense inhibitory avoidance training. *Neurobiology of Learning and Memory*. 140: 17-26.

Gourley SL y Taylor JR. (2016). Going and stopping:dichotomies in behavioral control by the prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*. 19 (5),655-664.

Gutiérrez-Guzmán BE, Hernández-Perez JJ y Olvera-Cortés ME. (2017). Serotonergic modulation of septo-hippocampal and septo-mammillary theta activity during spatial learning, in the rat. *Behavioural Brain Research*. 319, 73–86.

Hilgard ER y Bower GH. (1983). *Teorías del aprendizaje México: Trillas*.

Huchín-Ramírez TC. (2007). Efectos sobre la consolidación de la memoria producidos por el bloqueo de la síntesis de proteínas en la corteza insular. Tesis. Maestría en Ciencias (Neurobiología). Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla, Qro.

Igaz LM, Vianna MRM, Medina JH e Izquierdo I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *Journal Neuroscience*. 22: 6781–6789.

Izquierdo I, Furini CRG y Myskiw JC. (2016). Fear memory. *Physiological Reviews*. 96 (2), 695-750.

Juárez Y, Medina AC, Quirarte GL y Prado-Alcalá RA. Efecto de la microinyección de anisomicina en la amígdala cerebral sobre la consolidación de la memoria mediada por diferentes intensidades de reforzador negativo. *Jornadas del Instituto de Neurobiología. XVIII Aniversario, C-41. Juriquilla, Querétaro; del 19 al 23 de septiembre del 2011.*

Kandel ER. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Science*. 294, 1030-1038.

Katz JJ, y Halstead WC. (1950). Protein organization and mental function. *Comparative Psychology Monographs*. 20, 103.

Koenig J, Conquer B y Cassel JC. (2008). Activation of septal 5-HT_{1A} receptors alters spatial memory encoding, interferes with consolidation, but does not affect retrieval in rats subjected to a water-maze task. *Hippocampus*. 18(1):99-118.

Muñoz-Sánchez S, Medina AC, Quirarte GL y Prado-Alcalá RA. (2010) Efectos de la administración de anisomicina, inhibidor de la síntesis de proteínas, en la corteza insular sobre la memoria de corto plazo de un aprendizaje incrementado en una tarea de evitación inhibitoria. LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Villahermosa, Tab.

Martin KC, Casadio A, Zhu, H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH y Kandel, ER. (1997). Synapse-specific, long-term facilitation of *Aplysia* sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell*. 91, 927–938.

McGaugh J L. (1966). Time-dependent process in memory storage. *Science*. 153: 1351-1358.

McGaugh J L. (2000). Memory-a century of consolidation. *Science*. 287(5451), 248-251.

McGaugh JL. (2015). Consolidating Memories. 66,1-24.

McIntyre CK, McGaugh JL y Williams CL. (2012). Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 36,1750-62.

Nader K y Hardt O. (2009). A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neurosciences*. 10: 224-234.

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington (DC): National Academies Press (US). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>

Paxinos, G y Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Burlington, M.A. 6th Edition.

Pedreira ME, Dimant B y Maldonado H. (1996). Inhibitors of Protein and RNA Synthesis Block Context Memory and Long-Term Habituation in the Crab *Chasmagnathus*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 54: 611-617.

Prado-Alcalá RA, Haiek M, Rivas S, Roldán-Roldán G y Quirarte GL. (1994). Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology and Behavior*.56:27-30.

Prado-Alcalá RA. (1995). Serial and parallel processing during memory consolidation. *Plasticity in the Central Nervous System. Learning and Memory*. Editado por JL. McGaugh, F Bermúdez-Rattoni, y RA Prado-Alcalá, Lawrence Erlbaum Publishers, Mahawah, New Jersey. 57-65.

Prado-Alcalá RA. (1998) ¿Dónde se encuentra la memoria? *Ciencias*, 49, 26-29.

Prado-Alcalá RA, y Quirarte G L. (1998). De la memoria y el cerebro. En R De la Fuente y J. Alvarez-Leefmans (Eds.), *Biología de la mente* (pp. 245-256). México: El colegio Nacional y Fondo de Cultura Económica.

Prado-Alcalá RA, Medina AC, López NS y Quirarte GL. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*. 23:501-508.

Prado-Alcalá RA, Salado-Castillo R, Quiroz C, Garín-Aguilar ME, Díaz-Trujillo A, Rivas-Arancibia S y Quirarte GL. (2007). Enhanced learning protects brain against effects of amnesic treatments. En F Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging*. Boca Raton, FL: CRC Press. 175-191.

Puig MV, Celada P y Artigas F.(2004). Control serotoninérgico de la corteza prefrontal. *Revista de Neurología*. 39(6):539-534.

Qi Z y Gold PE. (2009). Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. *Learning and Memory*.16 (5):308-314.

Quevedo J, Vianna MRM, Roesler R, de Paris F, Izquierdo I y Rose SPR. (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 and Memory*. 6, 600-607.

Quirarte GL, Roozendaal B y McGaugh JL. (1997). Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Neurobiology*. 14048 – 14053.

Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B y McGaugh JL. (1998). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Research*. 808,134-40.

Rodríguez-Serrano LM, Medina AC, Quirarte GL y Prado-Alcalá RA. (2009). La inhibición de la síntesis proteínica en el hipocampo dorsal no interfiere con la consolidación de la memoria de un aprendizaje sobrerreforzado. LII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Morelia, Mich.

Roozendaal B, Barsegyan A. y Lee S. (2008). Adrenal stress hormones, amygdala activation, and memory for emotionally arousing experiences. *Progress in Brain Research*. 167, 79-97.

Sadowski RE, Canal CE y Gold PE. (2011). Lidocaine attenuates anisomycin-induced amnesia and release of norepinephrine in the amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory*. 96 ,136–142.

Santini E, Ge H, Peña de Ortiz S y Quirk. (2004). Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*. 24(25), 5704-5710.

Sharma AV, Nargang FE y Dickson CT. (2012). Neurosilence: Profound Suppression of Neural Activity following Intracerebral Administration of the Protein Synthesis Inhibitor Anisomycin. *The Journal of Neuroscience*. 32(7):2377–2387.

Squire LR. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*. 82, 171-177.

Squire LR. y Barondes S. (1970). Actinomycin-D: effects of memory at different times after training. *Nature*. 225: 649-650.

Torres Garcia. (2012). Efecto de la inhibición de la transcripción en el hipocampo dorsal sobre la consolidación de la memoria de un aprendizaje incrementado. Tesis. Maestría en Ciencias (Neurobiología). Universidad Nacional Autónoma de México. Juriquilla, Querétaro.

Touzani K, Puthanveetil SV y Kandel ER.(2007). Consolidation of learning strategies during spatial working memory task requires protein synthesis in the prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:5632-5637.

Vertes RP. (2004). Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse*. 51:32-58.

Wilson MA y Fadel JR. (2017), Cholinergic regulation of fear learning and extinction. *Journal of Neuroscience Research*. 95: 836–852.

Zhang Y, Fukushima H y 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, 4,4,1-11.

Apéndice I. Abreviaturas

ANI	Anisomicina	D-V	Dorso-Ventral
MCP	Memoria a corto plazo	M-L	Medio-lateral
MLP	Memoria a largo plazo	EI	Evitación Inhibitoria
ARN	Ácido ribonucleico	ACh	Acetilcolina
ISP	Inhibidores de la síntesis de proteínas	cAMP	3',5'- adenosín monofosfato cíclico
DRB	5,6-dicloro-1-- ribofuranosilbencimidazol	MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos
CXC	Cicloheximida	PKA	Proteína cinasa A
5-HT	Serotonina		
DA	Dopamina		
NE	Norepinefrina		
CPF	Corteza prefrontal		
mCPF	Corteza prefrontal medial		
CxPL	Corteza prelímbica		
IL	Corteza infralímbica		
NHI	National Institutes of Health		
ILAR	Institute for Laboratory Animal Research		
A-P	Antero-posterior		

Apéndice II. Índice de figuras

	Página
Figura 1. Representación gráfica de la división temporal de la memoria	3
Figura 2. Gráficas de cuantificación por HPLC de liberación de neurotransmisor	7
Figura 3. Cámara de evitación Inhibitoria	15
Figura 4. Corte representativo en el que se puede observar la trayectoria de una cánula	17
Figura 5. Desarrollo temporal para el experimento curva de intensidad	18
Figura 6. Resultados de las latencias de entrada y escape para los grupos de la curva de intensidad	19
Figura 7. Resultados latencias de retención de la curva de intensidad	19
Figura 8. Desarrollo temporal del experimento de memoria a corto plazo	21
Figura 9. Resultados de las latencias de entrada y escape para los grupos de memoria a corto plazo	22
Figura 10. Resultados latencias de retención de memoria a corto plazo	22
Figura 11. Desarrollo temporal del experimento dependencia de estado	24
Figura 12. Resultados de las latencias de entrada y escape para los grupos dependencia de estado	25
Figura 13. Resultados latencias de retención dependencia de estado	25

Apéndice III. Índice de tablas

		Página
Tabla 1.	Curva de intensidad	18
Tabla 2.	Memoria a corto plazo	21
Tabla 3.	Dependencia de estado	24