



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

Instituto de Fisiología Celular

**La consolidación y la actualización
de la memoria de largo plazo
requieren de la síntesis de proteínas**

Tesis para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias

Carlos J. Rodríguez Ortiz

Director de tesis: Dr. Federico Bermúdez Rattoni
Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria.

México, 2007





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.

*El amor es la pasión por la dicha del otro
Cyrano De Bergerac*

*A Raquelita, porque así, juntos,
vivimos y esculpimos nuestra vida*

Sabiendo tu nombre me siento seguro porque me has enseñado que eso me basta para contarte en mi levantar cuando he caído o simplemente para sonreír cuando así se antoja

A mis padres, Bárbara y Carlos

A mis hermanos, Bárbara y Gerardo

A mis abuelos, Caro y Chucho

A mi familia, Bicho, Carmona, Chui, Laurita, Pedro, Ana Laura, Martha R., Eugenio, Chucho, Chayo, Chivis, Monty, Laura, Carlos, Nena, Martha O., Claudia, Pedrito, José, Carlitos, Edurné, Martita, Rodrigo, Daniel P., Bianca, Aura, Carito, Ilse, Elisa, Eloísa, Yoael, Gina, Daniel V., Raque, Roque, Lolita, Félix, Sofía, Laura, Sra. Raquel, Sra. Antonia, Sr. Manuel, Benkey, Silvia, Víctor, Aldo, Aylén (la niña té), Rubí, Andrea (Andea bebé), Elsa y a Marce, ¡salud por allá, tío!

A mi tutor, Federico

A mis amigos, Mina y Javier

A mis compañeros de laboratorio, Israela, Paola, Luís, Paulina, Oreste, Ranier, Eduardo y a Vanesa, tu nombre sigue aquí

A mi comité, Martha y Gabriel

Al pueblo de México, que en dos de tus nombres ofreces oportunidades, Universidad Nacional Autónoma de México y CONACyT

Índice

Resumen	1
Abstract	2
I. La teoría de la consolidación de la memoria	3
II. La aparición de la hipótesis de la reconsolidación	9
III. Problemas de la hipótesis de la reconsolidación	15
IV. Similitudes y diferencias entre los procesos de consolidación y reconsolidación	20
V. Revaluación de la hipótesis de la reconsolidación: propuesta de la teoría de la consolidación de actualización	
V.1 Hipótesis y objetivos	23
V.2 Resultados obtenidos en el modelo de memoria gustativa	24
V.3 Resultados obtenidos en el modelo de memoria espacial	33
V.4 Discusión y conclusiones	43
VI. Bibliografía	49
VII. Apéndices	
VII.1 Material y métodos	53
VII.2 Publicaciones derivadas de este proyecto	55

Resumen

Hasta principios del año 2000, la consolidación de la memoria fue considerada como un proceso que se lleva a cabo exclusivamente en las memorias recientemente adquiridas. Este proceso es dependiente de la síntesis de proteínas en las neuronas y permite el almacenamiento de las memorias en el largo plazo. Sin embargo, una serie de estudios demuestran que después de su evocación, una memoria de largo plazo puede sufrir de un proceso similar a la consolidación; al que se conoce como reconsolidación. La evidencia principal que sostiene a la hipótesis de la reconsolidación se deriva de la gran cantidad de estudios que reportan que, después de su evocación, una memoria de largo plazo puede ser igualmente alterada por los tratamientos (principalmente farmacológicos) que interrumpen al proceso de consolidación. Sin embargo, hasta el día de hoy, no se tiene una teoría sólidamente apoyada en la evidencia que explique la función del proceso de reconsolidación. En este trabajo se propone que la reconsolidación es un proceso dependiente de la síntesis de proteínas, cuya función es la incorporación de información actualizada a un trazo de memoria. Durante este proceso, la memoria previamente consolidada es parcialmente desestabilizada y mediante la aplicación de tratamientos que afectan a la consolidación, la reconsolidación se observa como un proceso cuyo papel funcional es consolidar de nuevo a la memoria. Este trabajo apoya la teoría de que la llamada reconsolidación es más bien una consolidación de actualización que permite modificar a la memoria evocada, integrando información actualizada a la memoria de largo plazo.

Abstract

For a long time, consolidation was seen as a protein-synthesis-dependent process achieved only on newly acquired memories aimed to store them for the long term. However, pioneer and recent studies have demonstrated that after retrieval, long-term memories may once more undergo a consolidation-like process referred to as reconsolidation. Mainly, reconsolidation is sustained by the now widely reported observation that after a memory trace is activated by means of retrieval and is susceptible to disruption by the same treatments that disrupt memory during consolidation. However, the physiological role of this process is still a matter of debate. In the present work, evidence is provided that indicates that reconsolidation is indeed a process by which updated information is integrated through the synthesis of proteins to a memory trace. Through this process, previously consolidated memory is partially destabilized. By the infusion of disrupting agents, it appears as if the process is intended to consolidate memory again. Hence, the so-called reconsolidation seems more like an updating consolidation intended to modify retrieved memory by a process that integrates updated experience into long-term memory.

Capítulo I

La teoría de la consolidación de la memoria

La memoria puede ser clasificada de acuerdo a su duración. La primera clasificación formal en este sentido la realizó Hermann Ebbinghaus y después fue desarrollada por William James. En sus trabajos se estableció que la memoria tiene dos estadios, uno de corto y otro de largo plazo. Además, mostraron que no existe un tiempo específico que divida a estos dos estadios, pero que entre ellos media el proceso de consolidación. Solamente la memoria de largo plazo atraviesa por el proceso de consolidación, el cual fortalece a la memoria a través del tiempo y permite su almacenamiento en forma estable. Ya que la memoria de corto plazo no atraviesa por el proceso de consolidación, ésta decae mucho más temprano en el tiempo (Figura 1).

El término consolidación se adjudica a los investigadores Müller y Pilzecker por sus trabajos reportados en el año 1900. Estos investigadores pidieron a un grupo de sujetos que aprendieran una lista de pares de sílabas. Durante la prueba de memoria se les presentó a los sujetos una de las sílabas del par y el número de sílabas complementarias recordadas fue usado como medida de memoria. Uno de los descubrimientos más importantes de estos trabajos es que el aprendizaje de una segunda lista, poco tiempo después del aprendizaje de la primera, deteriora el número de sílabas recordadas de la primera lista. Además, Müller y Pilzecker encontraron que entre más tiempo transcurre entre el aprendizaje de la primera lista y la presentación de la segunda, menor es el efecto sobre el recuerdo de la primera lista. Ellos concluyeron que el aprendizaje de la segunda lista interfiere con un

proceso fisiológico que, con el tiempo, permite el fortalecimiento de la memoria de la primera lista, proceso al que denominaron *consolidación* [1].

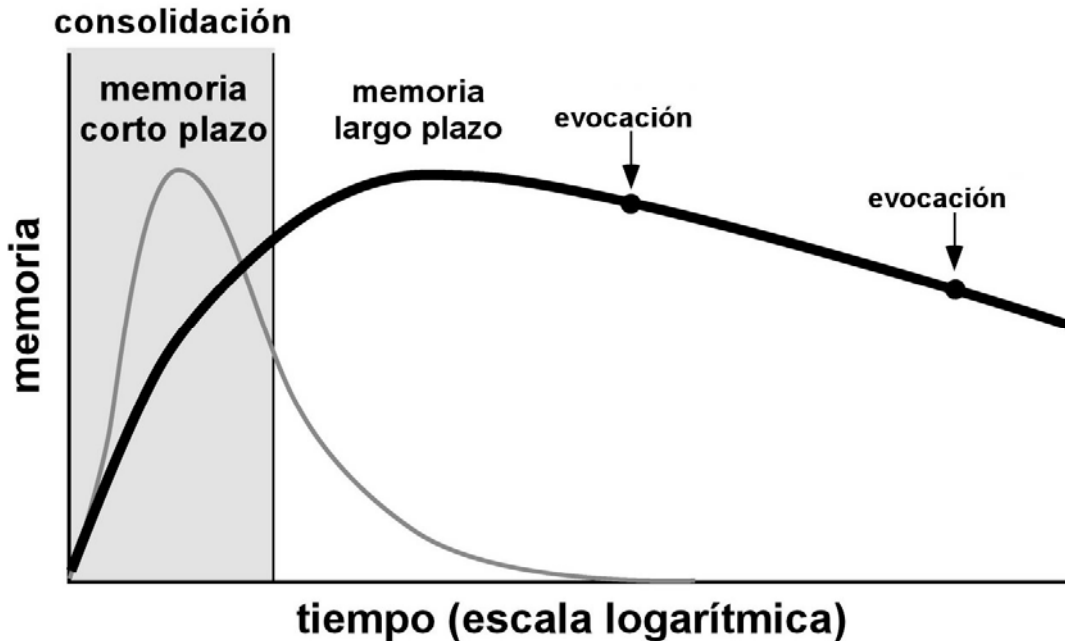


Figura 1. Representación esquemática de las memorias de corto y de largo plazo en el tiempo. El proceso de consolidación ocurre sólo para la memoria de largo plazo y permite que sea estable en el tiempo (modificado del reporte de Dudai, Y. *Annual Review of Psychology*. 2004, 55:51).

Estos trabajos fueron casi completamente ignorados hasta 1949 cuando Duncan demostró que la aplicación de choques electroconvulsivos poco después del entrenamiento deteriora la memoria. Además, reportó que el efecto sobre la memoria depende del intervalo temporal entre el entrenamiento y la aplicación de los choques electroconvulsivos. A partir de ese momento una gran cantidad de estudios han establecido que distintos tratamientos, desde choques electroconvulsivos hasta

inyecciones intracerebrales de inhibidores de la síntesis de proteínas, aplicados después de la **adquisición**¹ evitan el almacenaje de la memoria de largo plazo [2,3].

Un cambio importante en el campo de la investigación de la memoria ocurrió con la propuesta de Hebb, llamada la teoría del trazo dual. Hebb sugirió que la memoria es, en un primer estadio, un ensamble de neuronas en reverberación cuyo estado es lábil. La memoria se estabiliza gracias a cambios celulares en el ensamble, dando lugar a la memoria de largo plazo [4]. Aunque todavía se discute si la memoria de corto y de largo plazo son procesos que se dan uno después del otro (en serie) o, ambos al mismo tiempo (en paralelo), la teoría de Hebb tuvo un gran impacto porque señaló la importancia que las neuronas tienen en el procesamiento de la memoria, lo que condujo a que la investigación en el tema abordara los eventos intracelulares que ocurren durante la formación de la memoria. A nivel celular, la memoria de corto plazo se refleja en la activación de cascadas de **transducción**² (principalmente vías de cinasas) que se da después de la estimulación neuronal. La memoria de corto plazo permanece mientras estas cascadas estén activas pero, en la memoria de largo plazo, la señal de las cascadas llega al núcleo celular donde se lleva a cabo la **transcripción**³. Después de esto, se da la **traducción**⁴ para la síntesis de nuevas proteínas. Estas proteínas son las que conducen a los **cambios plásticos**⁵ de las células. Los cambios plásticos, se presume son, el correlato celular de un trazo de

¹ **adquisición.** Fase de la memoria en la que se da la entrada de información a través de uno o de varios sistemas sensoriales para su almacenaje. Sinónimo de aprendizaje.

² **transducción.** El proceso por el cual una célula convierte una señal extracelular en una respuesta celular [5].

³ **transcripción.** El proceso por el cual se sintetiza ARN usando como molde el ADN [6].

⁴ **traducción.** El proceso por el cual se sintetizan las proteínas usando como molde el ARN [6].

⁵ **cambios plásticos.** En el contexto del aprendizaje y la memoria, se refieren a las modificaciones que sufren los circuitos cerebrales en respuesta a la experiencia.

memoria de largo plazo, esto es, los cambios plásticos son la expresión celular de la consolidación. Esto nos lleva a que la consolidación requiere de la síntesis de proteínas. En apoyo a esta idea están la gran cantidad de estudios que reportan que la inhibición de la síntesis de proteínas interrumpe la formación de las memorias de largo plazo sin afectar a las de corto plazo [3,7-9].

Un ejemplo de este tipo de estudios es el trabajo de Barondes y Cohen [85]. En ese reporte se inyectó cicloheximida, un inhibidor de la traducción, en el cerebro de ratones 5 min antes del entrenamiento en una tarea de memoria. La tarea se realizó en un laberinto en forma de "T" y los animales aprendieron que podían evitar un choque eléctrico si se movían a un brazo específico del laberinto. Cuando la prueba de memoria se realizó 3 hrs después del entrenamiento, los autores no observaron un deterioro en la memoria. Sin embargo, cuando la prueba la realizaron en tiempos posteriores, la memoria estaba severamente afectada. Además, en ese mismo reporte se determinó que se requiere de una inhibición considerable de la síntesis de proteínas (mayor al 90%) para observar el deterioro de la memoria.

De ese tipo de estudios se ha concluido que la inhibición de la síntesis de proteínas en el cerebro no afecta ni la adquisición, ni la evocación, ni la memoria de corto de plazo; solamente afecta a la memoria de largo plazo. El otro hallazgo fundamental de estos reportes es que existe una ventana temporal después de la adquisición en la cual es posible afectar a la memoria de largo plazo, fuera de esa ventana, la inhibición de la síntesis de proteínas no deteriora la memoria, razón por la cual, con la teoría de la consolidación viene implícita la idea de que las memorias se consolidan

solamente una vez [2,3]. Estas conclusiones se apoyan en las siguientes observaciones:

A pesar de inyectar el inhibidor de la síntesis de proteínas antes del entrenamiento, el aprendizaje es similar al de los animales con inyección de solución vehículo; eliminando la posibilidad de que la síntesis de proteínas sea necesaria para la adquisición.

Las inyecciones del inhibidor de la síntesis de proteínas afectan comúnmente a las memorias con un día o más de adquiridas, apoyando la idea de que la síntesis de proteínas no se requiere para las memorias de corto plazo.

Animales entrenados e inyectados con inhibidor no muestran un deterioro en la memoria si la prueba se realiza poco después del entrenamiento (usualmente en un rango de 3 hrs después de la adquisición). De esta observación se concluye que la síntesis de proteínas no es necesaria para la memoria de corto plazo.

Las inyecciones del inhibidor realizadas horas después del entrenamiento o durante la prueba de memoria no tienen efecto sobre la memoria. Con este punto se establece que la evocación de la memoria no requiere de la síntesis de proteínas y, que existe una ventana temporal dentro de la cual se puede afectar a la memoria de largo plazo.

Todos estos puntos han sido corroborados, y ampliamente revisados, a lo largo de los años en una serie de reportes que concluyen que la consolidación es un proceso dependiente de la síntesis de proteínas que permite el establecimiento de la memoria de largo plazo, explicando el enorme peso que tiene la teoría de la consolidación en la visión actual de la memoria [3,7-9].

Capítulo II

La aparición de la hipótesis de la reconsolidación

Por mucho tiempo la consolidación fue considerada como un proceso que se lleva a cabo exclusivamente en las memorias recientemente adquiridas para guardarlas por un largo plazo. Sin embargo, estudios pioneros [10,12,13] señalaron que las memorias previamente consolidadas podían sufrir más de una vez de un proceso similar a la consolidación.

En 1968, Misanin y colaboradores [10] enseñaron a un grupo de ratas a beber de una botella dentro de una caja. Después, los mismos animales fueron entrenados en la tarea de condicionamiento del miedo (*fear conditioning*); en la cual, un tono (estímulo condicionado, EC) es asociado a un choque eléctrico en las patas (estímulo incondicionado, EI). Como resultado de esta asociación se obtiene una respuesta condicionada que es utilizada como medida de memoria; en este caso, se observa una reducción en el número de lengüetazos que las ratas dan a la botella después de que inicia la presentación del tono. Acorde con los estudios previos, Misanin y colaboradores reportaron que la aplicación de choques electroconvulsivos inmediatamente después del condicionamiento interrumpe la consolidación de la memoria (Figura 2b, grupo 2). El resultado interesante surgió en el grupo 3. A esos

animales se les entrenó de la misma manera que al grupo 2, con la diferencia de que después del condicionamiento no se les aplicaron los choques electroconvulsivos. Un día después del entrenamiento, la memoria ya consolidada fue reactivada mediante la presentación del tono. Inmediatamente después se aplicaron los choques electroconvulsivos con la sorpresa de que esos animales no recordaron adecuadamente cuando se les realizó una prueba de memoria 24 hrs después de la reactivación (Figura 2b, grupo 3). Es importante notar que, los choques electroconvulsivos no afectaron a la memoria cuando ésta no fue reactivada (Figura 2b, grupo 4). A este fenómeno se le llamó amnesia dependiente de una clave (*cue-dependent amnesia*) [10]. Aunque un estudio en el año siguiente no replicó este fenómeno [11], el trabajo de Misanin y colaboradores alentó una serie de trabajos que desarrollaron la idea de que las memorias previamente consolidadas atraviesan por un estadio lábil si son reactivadas mediante su **evocación**¹. Como ejemplo de esto está el trabajo de Gordon, quien mostró que, al igual que ocurre en las memorias recientemente adquiridas, las memorias que son evocadas son susceptibles a ser alteradas solamente durante una ventana temporal después de su reactivación [12].

¹ **evocación**. Fase de la memoria en la que se tiene acceso a la información almacenada, y se permite que esté disponible para su uso.

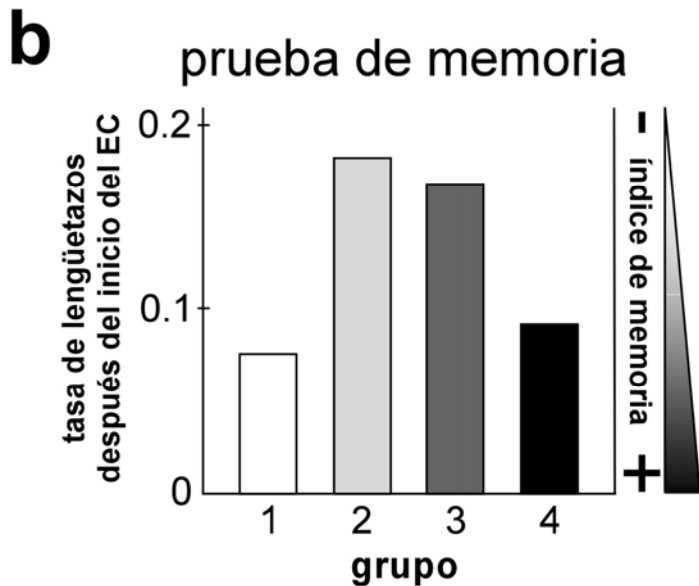
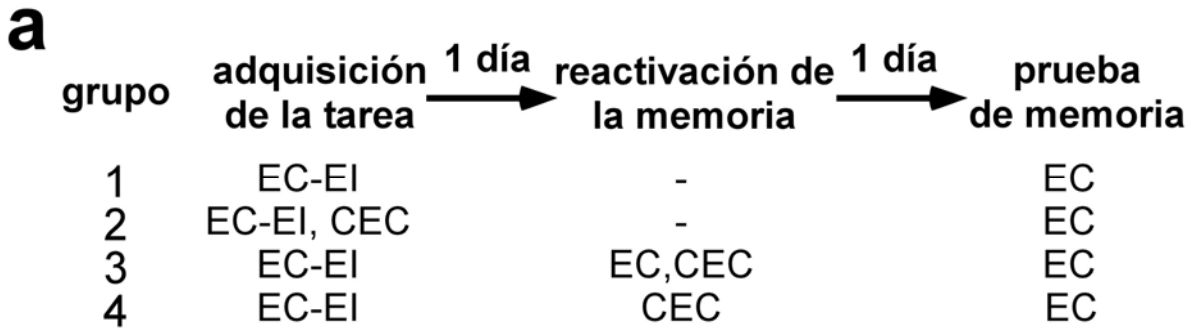


Figura 2. Datos del primer estudio que reportó alteración de una memoria de largo plazo tras su evocación. **a.** Representación esquemática del protocolo usado por Misanin y colaboradores. EC, estímulo condicionado (un tono de 80 dB con una duración de 10 seg el primer día de tratamiento, con una duración de 2 seg en el segundo día y de 10 seg o 10 lengüetazos en el día de la prueba). EI, estímulo incondicionado (un choque eléctrico a la gradilla del piso de 1.3 mA y con duración de 3 seg, aplicado al término de la presentación del EC). CEC, choques electroconvulsivos (un choque eléctrico de 40 mA y medio seg de duración, aplicado a través de un broche sujeto a las orejas de los animales). **b.** En el grupo 1 se muestra el comportamiento de los animales sometidos al condicionamiento del miedo bajo este protocolo; como medida de memoria se utilizó la reducción de lengüetazos observada después del inicio del tono. Los CEC deterioran a la memoria de largo plazo cuando son aplicados después del condicionamiento (grupo 2) o cuando son aplicados después de la reactivación de la memoria (grupo 3). El grupo 4 es la demostración de que el efecto de los CEC sobre el grupo 3 depende de la reactivación de la memoria. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria (modificado del reporte de Misanin, J.R. y colegas. 1968. *Science*, 160:554).

El concepto de amnesia dependiente de una clave fue desarrollada por Lewis en su modelo de memoria activa-inactiva [13]. Lewis propuso que las memorias pueden estar activas, y por lo tanto lábiles, bajo dos condiciones: cuando son adquiridas y cuando son reactivadas mediante su evocación. En cualquier otro momento las memorias están inactivas y estables. A pesar de la gran cantidad de evidencia, estos trabajos fueron ignorados por la gran mayoría de los investigadores en el campo hasta años recientes que se retomó el estudio de este fenómeno, refiriéndose a él como reconsolidación.

La teoría de la reconsolidación propone que las memorias evocadas regresan a un estadio lábil similar a la de las recién adquiridas [14,15]. En 1992, Bucherelli y Tassoni [16] reportaron que la inactivación del núcleo parabraqueal deteriora a las memorias previamente consolidadas si éstas son evocadas. De manera similar, el grupo de Susan Sara mostró que la aplicación de antagonistas de receptores tipo NMDA o de tipo β -adrenérgico (los cuales evitan la formación de la memoria de largo plazo si son aplicados después de la adquisición) deterioran a un trazo de memoria de largo plazo si éste es evocado [17-19]. Desde entonces, el proceso de reconsolidación de la memoria ha sido intensamente estudiado. El reporte más significativo al respecto es el realizado por Nader y colegas en el año 2000 [20]. Este trabajo atrajo la atención de la comunidad al tema de la reconsolidación por dos razones. La primera es que se utilizó una de las tareas más usadas para medir memoria, el condicionamiento del miedo. La segunda es que estos investigadores demostraron que la inhibición de la síntesis de proteínas, en condiciones que interrumpen a la consolidación, también deteriora a la memoria si ésta es evocada.

Similar al reporte de Misanin y colaboradores, Nader y colegas condicionaron ratas para que asociaran un tono a un choque eléctrico en las patas, pero ellos midieron la memoria como el porcentaje del tiempo que la rata permanece inmóvil (exceptuando los movimientos necesarios para respirar) del tiempo total que el tono es presentado; a esto se le llama inmovilización (*freezing*). Al día siguiente del entrenamiento se inyectó anisomicina (un inhibidor de la síntesis de proteínas) en la amígdala después de la presentación del tono. Cuando estos sujetos fueron probados 24 hrs después, se desempeñaron pobremente en esta tarea de memoria en comparación a los animales que no fueron inyectados con anisomicina (Figura 3b). El mismo tratamiento, en la ausencia de la presentación del tono, no deteriora a la memoria (Figura 3b, grupo 3). Además, en este trabajo se demostró que la anisomicina solamente tiene efecto durante una ventana temporal después de la evocación, esto es, la inyección de anisomicina aplicada 6 hrs después de la evocación no tiene efecto alguno en la memoria consolidada. En los años siguientes al estudio de Nader y colaboradores, un gran número de reportes han mostrado que la reconsolidación es un proceso que se lleva a cabo en diferentes especies animales y en diferentes tipos de memorias [21-30].

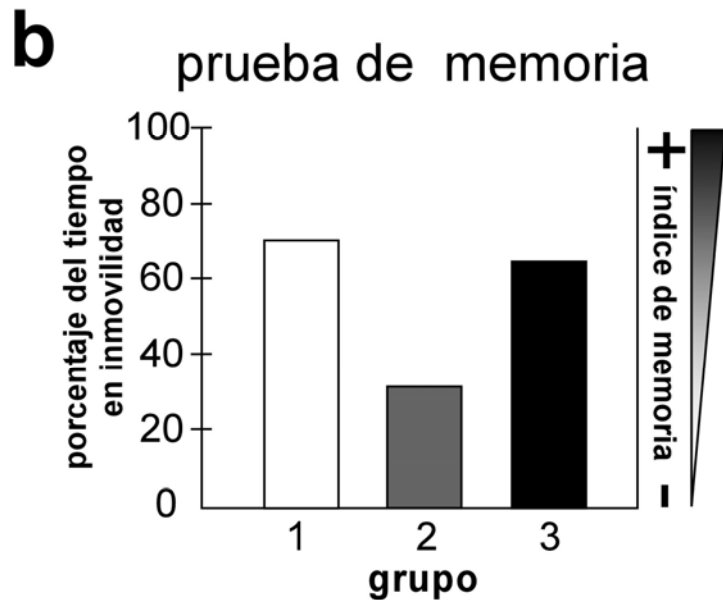
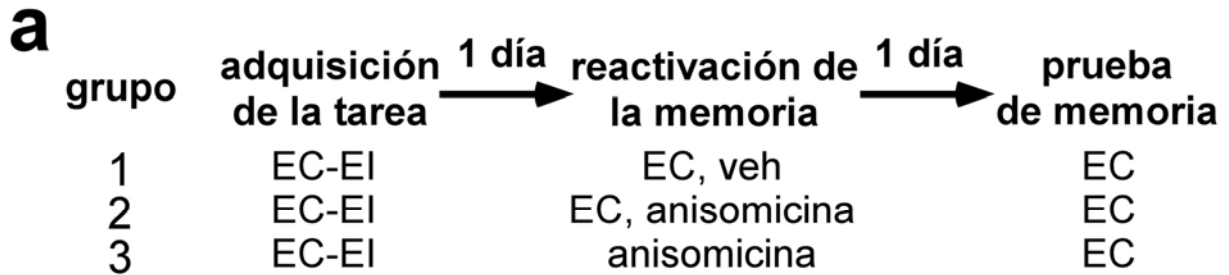


Figura 3. La aplicación de un inhibidor de la síntesis de proteínas en la amígdala deteriora la memoria previamente consolidada. a. Representación esquemática del protocolo utilizado por Nader y colegas. EC, estímulo condicionado (un tono de 75 dB y 5 KHz aplicado por 30 seg). EI, estímulo incondicionado (un choque eléctrico aplicado a las patas de 2 mA durante 1 seg al término del EC). veh, solución vehículo. Anisomicina (62.5µg/0.5µL por hemisferio). **b.** En el grupo 1 se observa la conducta de los animales condicionados el día de la prueba; como medida de memoria se utilizó el tiempo que los animales permanecieron inmóviles del tiempo total que el tono fue presentado. La anisomicina deteriora la memoria previamente consolidada cuando es aplicada después de la reactivación (grupo 2). El grupo 3 es la demostración de que el efecto observado en el grupo 2 depende de la reactivación de la memoria. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria (modificado del reporte de Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E. 2000. *Nature*, 406:722).

Capítulo III

Problemas de la hipótesis de la reconsolidación

A pesar de la gran cantidad de experimentos que apoyan a la teoría de la reconsolidación, una serie de estudios recientes han reportado que una memoria consolidada no es susceptible a ser alterada tras su evocación. Estos estudios concluyen que la reconsolidación no es un proceso que participe en la formación de todas las memorias [31-34]. Aunque en un principio resultó complicado incorporar estas observaciones a la teoría de la reconsolidación, se han logrado avances que permiten comprender por qué no se observa el proceso de reconsolidación bajo ciertos protocolos [26,35,36]. Pero para abordar este punto, primero tenemos que revisar lo que se conoce como extinción. Para esto, hay que retomar el protocolo de condicionamiento clásico que es ampliamente utilizado en las tareas para medir memoria. En el condicionamiento clásico se le presenta a un sujeto un estímulo condicionado, como un tono, seguido de un estímulo incondicionado, como un choque eléctrico a las patas. Como resultado, los dos estímulos se asocian y cuando se presenta nuevamente el estímulo condicionado el sujeto ejecuta una respuesta que es utilizada como medida de memoria, como la inmovilización. Sin embargo, la presentación del estímulo condicionado en la ausencia del estímulo incondicionado provoca una disminución paulatina en la ejecución de la respuesta, en este caso, el sujeto reduce el tiempo que permanece inmóvil. Este cambio en la respuesta es la extinción. En la extinción, el estímulo condicionado es ahora asociado con la

ausencia del estímulo incondicionado. Como sucede después de la adquisición de cualquier tarea, la extinción se consolida.

En la gran mayoría de los trabajos que abordan la reconsolidación se presenta únicamente el estímulo condicionado para inducir la evocación, lo cual puede conducir a la extinción. En estas condiciones, la aplicación de tratamientos durante la sesión de evocación puede tener uno de dos efectos opuestos. En un primer escenario se obtiene un deterioro del trazo de memoria del condicionamiento. Razón por la cual, durante la prueba de memoria se observa una disminución de la respuesta condicionada, esto es, un efecto sobre el proceso de reconsolidación. El otro resultado posible es la interrupción del proceso de consolidación de la extinción, lo que se refleja a nivel conductual como un buen desempeño de la respuesta condicionada. En este segundo caso los resultados pueden ser interpretados como una ausencia del proceso de reconsolidación. En este sentido, reportes como el de Vianna y colaboradores [32] y, el de Berman y Dudai [31] muestran que la inhibición de la síntesis de proteínas evita la extinción, dejando intacta, o inclusive fortalecida, la memoria del condicionamiento después de su evocación. En estos dos estudios se concluyó que la reconsolidación no ocurre bajo estos protocolos. Sin embargo, el trabajo posterior de Pedreira y Maldonado [35] permitió aclarar estos resultados.

En su estudio, Pedreira y Maldonado entrenaron cangrejos en una tarea de memoria contextual. En esta tarea se coloca a los cangrejos en un contexto espacial particular y se les pasa un objeto por arriba. En un principio estos animales huyen del objeto en movimiento pero, cuando este protocolo se repite en varias ocasiones, la respuesta

cambia y ahora los animales se inmovilizan cuando se presenta el objeto en movimiento. Esto sólo sucede si los animales están en el contexto en donde se adquirió la tarea, los cangrejos no se inmovilizan con la presentación del objeto en movimiento si son cambiados de contexto espacial. Entonces, en esta tarea de condicionamiento, los estímulos que se asocian son el contexto y el objeto en movimiento y, la respuesta que se usa como medida de memoria es la inmovilización de los animales. Para obtener la extinción de esta tarea, los cangrejos son colocados en el contexto en donde se adquirió el condicionamiento pero se omite la presentación del objeto en movimiento. Como sesión de evocación, Pedreira y Maldonado colocaron dos grupos de cangrejos condicionados en el contexto espacial en el que fueron entrenados en ausencia del objeto en movimiento. Un grupo se dejó por 5 y el otro por 60 min y se les inyectó, antes de realizar la conducta y de manera sistémica, el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida. Durante esta sesión se observó una diferencia importante entre los grupos, los animales expuestos al contexto por 5 min no tuvieron extinción; por el contrario, los expuestos por 60 min tuvieron una clara extinción del condicionamiento. Cuando se realizó la prueba de memoria 24 hrs después, el grupo expuesto por 5 min presentó un mal desempeño de la respuesta condicionada (los animales no se inmovilizaron), esto es, se afectó el proceso de reconsolidación. Por el otro lado, el grupo expuesto por 60 min tuvo un buen desempeño de la conducta condicionada (los animales si se inmovilizaron). En este grupo la inyección de cicloheximida interrumpió el proceso de consolidación de la extinción [35].

Estos resultados han sido replicados en reportes posteriores [26,36]. Por ejemplo, Eisenberg y colegas [26] obtuvieron resultados similares en ratas entrenadas en una tarea de aversión a un sabor. En la adquisición de esta tarea se inyecta en el peritoneo de los animales un agente que produce malestar gástrico (LiCl) después de que beben un líquido con sabor dulce. La asociación entre el sabor y el malestar produce una memoria de aversión de largo plazo que se ve reflejada en una reducción del consumo del sabor dulce en la siguiente ocasión en que se les presenta. Como en esta segunda presentación del sabor no se les inyecta LiCl, en una tercera presentación, las ratas incrementan su consumo del sabor dulce, esto es, extinguen la memoria de aversión. La inyección de un inhibidor de la síntesis de proteínas en la segunda presentación del sabor interrumpe la consolidación de la extinción. Los animales en estas condiciones desempeñan adecuadamente la tarea de aversión y, por lo tanto, no se detecta el proceso de reconsolidación. Por el contrario, si se somete a las ratas al protocolo de aversión en dos sesiones consecutivas, cuando se les presenta el sabor en una tercera y en una cuarta ocasión estos animales no extinguen la aversión. Bajo este protocolo, la inhibición de la síntesis de proteínas en la tercera presentación produce una disminución en la conducta de aversión en la cuarta presentación, esto es, se afecta el proceso de reconsolidación.

En ese mismo trabajo, se presentan resultados similares obtenidos en peces entrenados en una tarea de condicionamiento del miedo. Consistente con los datos obtenidos en ratas, la inhibición de la síntesis de proteínas evita la consolidación de la extinción si se realiza en la sesión que conduce a la extinción y, la misma inhibición

en una sesión que no conduce a la extinción, evita la reconsolidación. Estos estudios indican que el proceso de reconsolidación no se puede observar si en la sesión de evocación se inicia la consolidación de la extinción.

Otros autores han encontrado que la aplicación de fármacos en la sesión de evocación deteriora la memoria de largo plazo, solamente en memorias que han sido recientemente consolidadas [37,38]. En estos trabajos se reporta que los inhibidores de la consolidación tienen efecto sobre la memoria mientras la sesión de evocación se realice en los días posteriores a la adquisición, conforme la sesión de evocación se separa en el tiempo del entrenamiento la memoria deja de ser susceptible a estos inhibidores. Estos reportes apoyan la idea de que la reconsolidación es un proceso que solamente se lleva a cabo tras la evocación de memorias recientemente consolidadas. Sin embargo, Suzuki y colegas [36] aportaron evidencia a favor de que las memorias más viejas y fuertes también son susceptibles de ser deterioradas, tras su evocación. Estos investigadores usaron una sesión de evocación más larga e inyectaron un inhibidor de la síntesis de proteínas. Cuando realizaron la prueba de memoria de largo plazo observaron que las memorias viejas ya consolidadas también son susceptibles de ser alteradas por el inhibidor de la síntesis de proteínas, siempre y cuando, la sesión de evocación no condujera a la extinción. Esto indica que la fuerza del recordatorio durante la evocación está directamente relacionada a la susceptibilidad de la memoria de ser alterada tras su evocación.

Capítulo IV

Similitudes y diferencias entre los procesos de consolidación y reconsolidación

Probablemente la pregunta más importante en relación al proceso de reconsolidación es: ¿Porqué, y bajo que circunstancias, se lleva a cabo? En un primer análisis puede resultar ilógico pensar que el papel de este proceso es realizar, otra vez, un proceso previamente realizado, esto es, consolidar una vez más una memoria ya consolidada como implica el término reconsolidación. Apoyando esta idea, varios reportes indican que los eventos moleculares que se producen en una región del cerebro durante la consolidación, también se realizan durante la reconsolidación de la misma memoria [20,23,24,26,39-43].

Por ejemplo, para distintas tareas de memoria se ha demostrado la necesidad de la activación de factores de transcripción particulares, tanto en la consolidación como en la reconsolidación del mismo trazo de memoria. Kida y colaboradores [40] entrenaron ratones en la tarea de **condicionamiento del miedo a un contexto**¹ y demostraron la participación de CREB tanto en la fase de consolidación como en la de reconsolidación. También, entrenando ratones, Bozon y colaboradores [41] reportaron la necesidad de la activación de zif268 para la consolidación y la reconsolidación de la **memoria de reconocimiento**² de objetos y; finalmente, Merlo y

¹ **condicionamiento del miedo a un contexto.** En este protocolo, un contexto espacial particular (estímulo condicionado) es asociado a un choque eléctrico en las patas (estímulo incondicionado). De manera similar al condicionamiento del miedo a un tono, la respuesta utilizada como medida de memoria es la inmovilización del sujeto.

² **memoria de reconocimiento.** Este tipo de memoria refleja experiencia previa con un estímulo particular, lo que permite discriminar entre estímulos nuevos y familiares. Las tareas que miden este

colaboradores [42] usaron el entrenamiento de cangrejos descrito anteriormente para demostrar la participación de NF- κ B en la consolidación y la reconsolidación de la memoria de contexto.

Entrenando ratas en la tarea de condicionamiento del miedo, Duvarci, Nader y LeDoux [43] reportaron que la vía de transducción de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK, por sus siglas en inglés) se activa en la amígdala tanto en la fase de consolidación como en la de reconsolidación. Es más, Sangha y colegas [24] reportaron que en el caracol *Lymnaea stagnalis*, la síntesis de proteínas que subyace a la consolidación y la reconsolidación no sólo se dan en la misma región sino en la misma célula. Estos datos apoyan la hipótesis de que la reconsolidación es, efectivamente, un proceso que realiza una vez más la consolidación [15].

Sin embargo, otra serie de trabajos sugiere que la consolidación y la reconsolidación son procesos cualitativamente distintos. Taubenfeld y colaboradores [44] reportaron que el factor de transcripción C/EBP β se activa en el hipocampo dorsal durante la consolidación, pero no durante la reconsolidación, de la memoria de un contexto. Tronel y Sara [45] demostraron que la síntesis del factor de transcripción c/Fos se da en regiones diferentes del cerebro después de la evocación, en comparación con las regiones en donde se sintetiza c/Fos después de la adquisición de una tarea de memoria de olores. En este mismo sentido, Kelly y colaboradores [28] reportaron un

tipo de memoria se basan en la tendencia natural de los roedores a explorar objetos nuevos. En una primera fase, los animales exploran un objeto nuevo y, después de una fase de espera, una copia del objeto previamente experimentado se presenta junto con otro objeto, con el cual no se ha tenido experiencia. Los animales exploran más el objeto que no había sido presentado, indicando que reconocen al objeto presentado en la primera fase.

incremento en la **fosforilación**³ de las cinasas ERK en la corteza entorrinal y en el giro dentado del hipocampo después del entrenamiento en una tarea de reconocimiento de objetos, pero un incremento de la fosforilación de estas cinasas en la región CA1 del hipocampo y en la corteza entorrinal después de la evocación de esta memoria. Gutiérrez y colaboradores [46] reportaron que la actividad de los receptores metabotrópicos de acetilcolina es necesaria en la corteza gustativa para la consolidación de la memoria de un sabor, pero no para que se mantenga en el almacén de largo plazo después de ser evocada. De manera similar, se requiere de la síntesis de proteínas en la amígdala central para la consolidación, pero no para la reconsolidación, de la memoria de aversión a un sabor [47]. Por último, Lee y colaboradores [48] encontraron papeles inversos para el factor de crecimiento BDNF y el factor de transcripción zif268 en la misma región cerebral. El primero participa en la consolidación, pero no en la reconsolidación; y el segundo en la reconsolidación, y no en la consolidación, de la misma memoria. Toda esta evidencia ayuda a descartar la posibilidad de que la reconsolidación sea una recapitulación de la consolidación pero no resuelve el problema central: ¿Cuál es el papel fisiológico de la reconsolidación?

³ **fosforilación.** Reacción en la que un grupo fosfato se une covalentemente a otra molécula [5].

Capítulo V

Revaluación de la hipótesis de la reconsolidación: propuesta de la teoría de la consolidación de actualización

V.1 Hipótesis y objetivos

Se ha sugerido en algunas revisiones que la reconsolidación es un proceso mediante el cual la información entrante es incorporada a memorias previamente consolidadas; sin embargo, la evidencia experimental a favor de esta idea es casi inexistente [13,14,49,50]. De esta propuesta nace la hipótesis de este proyecto que es que la reconsolidación es un proceso mediante el cual la información recientemente adquirida es integrada a un trazo de memoria previamente consolidado.

Para cumplir con este proyecto se abordaron los siguientes objetivos:

- Determinar si la memoria gustativa requiere de la síntesis de proteínas en la corteza insular para consolidarse como memoria de largo plazo, utilizando como modelo conductual la atenuación de la neofobia.
- Determinar si la memoria gustativa requiere de la síntesis de proteínas en la corteza insular para mantenerse en la memoria de largo plazo después de su evocación en condiciones en donde se adquiere información.
- Determinar si la memoria gustativa requiere de la síntesis de proteínas en la corteza insular para mantenerse en la memoria de largo plazo después de su evocación en condiciones en donde no se adquiere información.

- Corroborar que la memoria espacial requiere de la síntesis de proteínas en el hipocampo para consolidarse como memoria de largo plazo, utilizando como modelo conductual el laberinto acuático de Morris.
- Determinar si la memoria espacial requiere de la síntesis de proteínas en el hipocampo para mantenerse en la memoria de largo plazo después de su evocación en condiciones en donde se adquiere información.
- Determinar si la memoria espacial requiere de la síntesis de proteínas en el hipocampo para mantenerse en la memoria de largo plazo después de su evocación en condiciones en donde no se adquiere información.

V.2 Resultados obtenidos en el modelo de memoria gustativa

Cuando un sujeto se encuentra con un alimento nuevo consume menos de este que de uno familiar. Esta baja en la ingesta se conoce como neofobia. Conforme el individuo se familiariza con la sustancia, y confirma que no conlleva consecuencias nocivas, el consumo incrementa. Este incremento inducido por la experiencia se nombra atenuación de la neofobia (AN) (Figura 4) [51-55]. La atenuación de la neofobia es una conducta que perdura. Cada vez que el animal es expuesto a un sabor su consumo se incrementa hasta llegar a una meseta, sin importar si dos presentaciones son separadas por un largo tiempo [61].

La AN, junto con otras tareas de memoria, han servido como modelo para el estudio de los mecanismos celulares que procesan la memoria gustativa. De particular interés resultan los estudios realizados en la corteza insular, la cual ha quedado establecida como la estructura central en la formación de la memoria en el sistema gustativo

[46,56,57]. A nivel molecular se ha encontrado la liberación de neurotransmisores [58] y la activación de cinasas por fosforilación [59,60]. A pesar de esto, no se ha demostrado que la síntesis de proteínas en la corteza insular sea un requisito para la consolidación de esta memoria, utilizando como modelo la AN. Por esta razón, como primer punto de este trabajo se aplicó anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en la corteza insular para determinar si esta síntesis es necesaria para la conducta de AN.

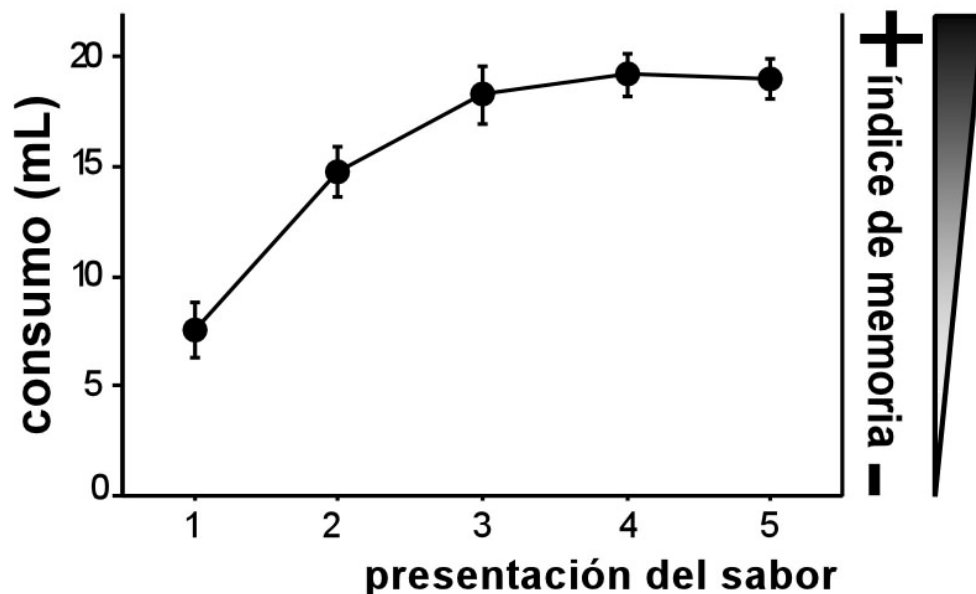


Figura 4. Conducta típica de la atenuación de la neofobia (AN). Consumo promedio \pm error estándar (en mL) de una solución de sacarina al 0.3% en ratas intactas. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria.

Como se muestra en la gráfica 5a, la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular es suficiente para evitar la AN. El grupo al que se le aplicó anisomicina presentó un consumo similar en la primera y en la segunda presentación del sabor, contrario a lo que sucede con el grupo control. El efecto de la anisomicina es

temporal ya que, en las siguientes presentaciones, se observa la AN. Además, cuando la anisomicina se aplicó 24 hrs después del primer consumo, la conducta no se vio alterada por lo cual no parece requerirse de la síntesis de proteínas para la consolidación de la AN después de 24 hrs (Figura 5a, inserto). Un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas reveló un efecto de grupo ($F(2,21) = 14.7, p < 0.01$), un efecto de ensayos ($F(4,84) = 100.23, p < 0.01$) e interacción de grupo x ensayos ($F(8,84) = 4.80, p < 0.01$). Una prueba *post-hoc* de Fisher indicó que el grupo inyectado inmediatamente después de la primera presentación del sabor es distinto del grupo vehículo y del grupo inyectado con anisomicina 24 hrs después de la presentación del sabor ($p < 0.01$). Estos resultados indican que la AN es una conducta desplegada por un proceso de memoria de largo plazo y que requiere de la síntesis de proteínas en la corteza insular para poder ser consolidada.

Hasta hace poco tiempo se consideraba a la consolidación como el único proceso necesario para almacenar la información a largo plazo. Sin embargo, con los estudios que han demostrado que, con la evocación, una memoria estable (consolidada) es susceptible a ser alterada por tratamientos que afectan a la consolidación, esta premisa de la teoría de la consolidación ha tenido que ser revaluada. A la necesidad de volver a consolidar una memoria estable se le conoce como reconsolidación. Para abordar la reconsolidación de la AN se inyectó anisomicina en la corteza insular después de la segunda presentación del sabor. La inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular después del segundo consumo afectó la memoria previamente consolidada. Esto se observa en la gráfica 5b, los animales a los que se

les inyectó anisomicina tienen un consumo reducido durante la tercera presentación del estímulo con respecto al consumo durante la segunda presentación. Este efecto parece ser parcial ya que se observó que el consumo durante la tercera exposición es significativamente superior al de la primera presentación. Además, se observó que este efecto se mantiene aunque la segunda y la tercera exposición sean separadas por una semana (Figura 5c). Una prueba ANOVA de medidas repetidas mostró efecto de grupo ($F(3,35) = 4.12, p < 0.05$) e interacción de grupos x ensayos ($F(12,140) = 5.95, p < 0.01$). Una prueba *post-hoc* mostró que los grupos inyectados con anisomicina son diferentes de sus correspondientes grupos vehículo (p 's < 0.01), así como también de sus respectivos consumos durante la segunda presentación del sabor (p 's < 0.01). Estos resultados muestran que, después de la evocación de la memoria gustativa, se necesita de la síntesis de proteínas en la corteza insular para mantener en la memoria de largo plazo información previamente consolidada.

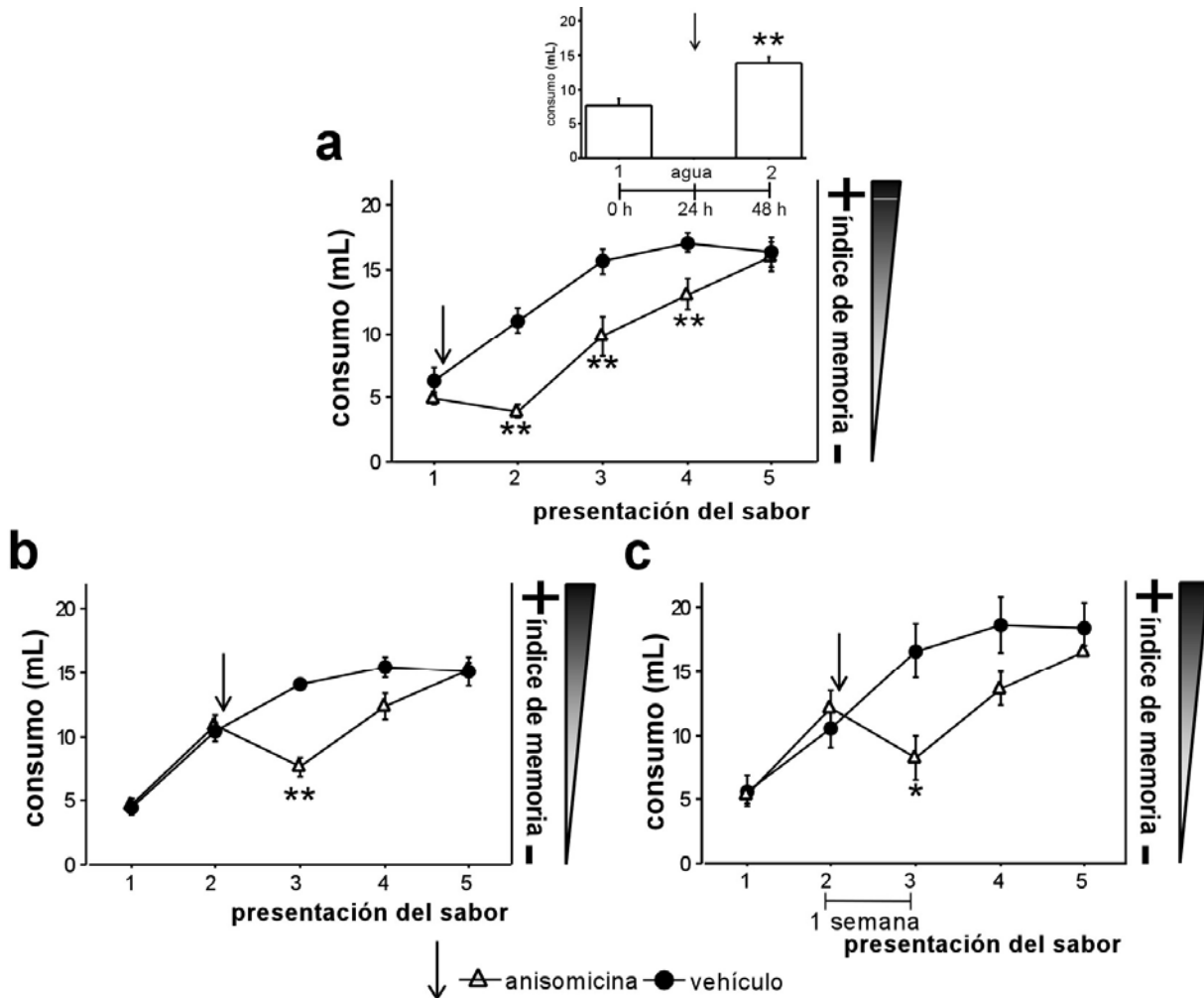


Figura 5. Efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza insular en la memoria gustativa. a. La anisomicina, aplicada inmediatamente después de la primera presentación del sabor, evita la consolidación de la AN. Sin embargo, si la anisomicina es aplicada 24 hrs después de la primera presentación del sabor (inserto), no se observa efecto. **b.** La anisomicina, después de la segunda presentación del estímulo, altera la memoria previamente consolidada. **c.** El efecto se mantiene aunque la tercera exposición sea una semana después. Las flechas indican el momento en el cual se inyectó anisomicina (triángulos blancos) o solución vehículo (círculos negros). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ entre el grupo con inyección de anisomicina y el grupo inyectado con solución vehículo. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria.

La AN es un proceso gradual en el que cada presentación del estímulo involucra un proceso de consolidación que permite que se lleve a cabo el siguiente punto de atenuación. Esta característica permite evaluar qué tanto la inhibición de la síntesis de proteínas afecta la memoria previamente consolidada después de su evocación. En este sentido, la anisomicina aplicada después del tercer consumo afectó el último punto de AN sin afectar el primero (consumo en la cuarta presentación del estímulo similar al del segundo) (Figura 6a). Una prueba ANOVA de medidas repetidas indicó diferencias únicamente entre las presentaciones ($F(4,80) = 64.49, p < 0.01$); sin embargo, una prueba *t-student* pareada reveló que el cuarto consumo es diferente significativamente del tercer consumo en el grupo inyectado con anisomicina ($t(11) = 4.52, p < 0.01$). Este dato indica que, mientras la información actualizada necesita de la síntesis de proteínas para ser incorporada, parte de la información previamente consolidada no requiere de la síntesis de proteínas en la corteza insular. Además, se inyectó el inhibidor de la síntesis de proteínas después del sexto consumo, punto en donde la conducta de la AN ha llegado claramente a su nivel máximo. En esta condición, la anisomicina ya no afectó a la AN (Figura 6b), sugiriendo que la memoria ya no es vulnerable a la inhibición de la síntesis de proteínas porque la memoria vieja está completamente consolidada y, en este punto, ya no existe más información relevante que necesite ser consolidada.

Una explicación alterna a estos resultados es que porque la curva de desempeño está en asíntota, el consumo sea similar en ambos grupos aunque la memoria si haya sido deteriorada. Para descartar esta posibilidad se inyectó anisomicina en la corteza insular en tres presentaciones consecutivas. En concordancia con los resultados

anteriores, la inhibición de la síntesis de proteínas, después de la cuarta presentación, deteriora parcialmente el trazo de memoria previamente consolidado. Una prueba ANOVA de medidas repetidas mostró interacción de grupo x presentaciones ($F(7,70) = 2.82, p < 0.05$). Sin embargo, a pesar de dos inyecciones adicionales de anisomicina, no se observó mayor efecto sobre la memoria (Figura 6c). Este resultado confirma que parte del trazo ya consolidado es independiente de la síntesis de proteínas en la corteza insular. Por último, se inyectó anisomicina en la corteza insular de la sexta a la octava presentación y no se observó efecto alguno en la conducta (Figura 6d).

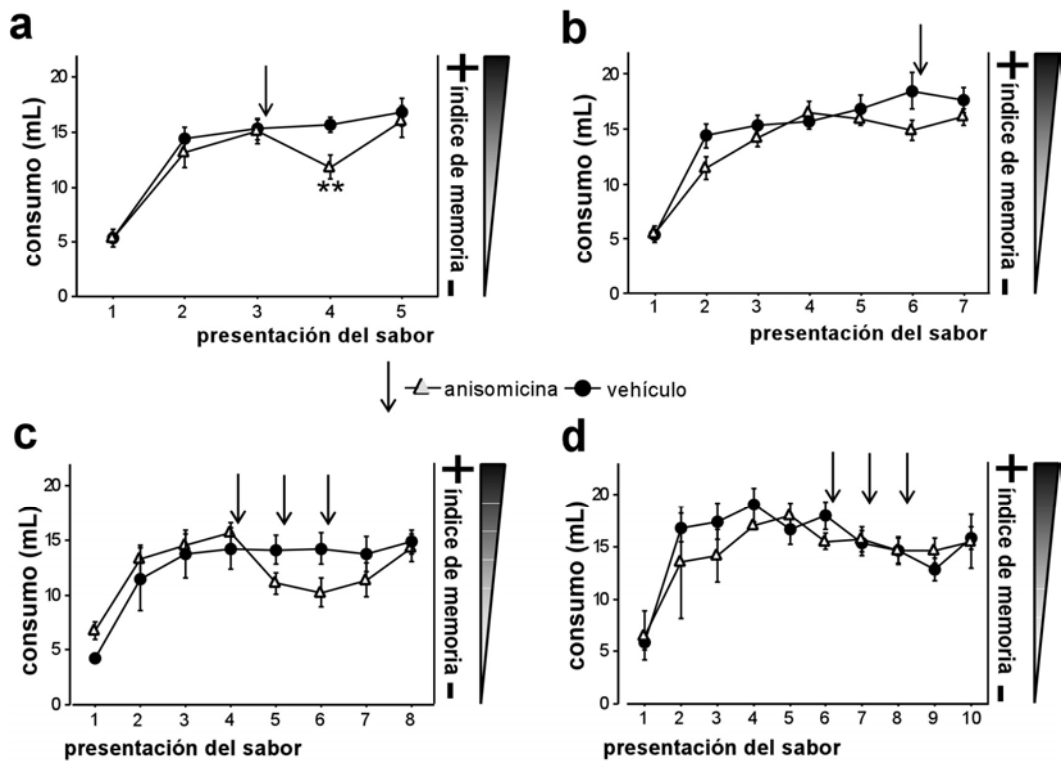


Figura 6. El efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas sobre puntos previos de consolidación se observa sólo hasta la meseta conductual. **a.** La inyección de anisomicina, después de la tercera presentación del sabor, altera el último proceso de consolidación, pero no afecta el proceso más viejo. **b.** La anisomicina, aplicada después de que se ha alcanzado el punto de atenuación máximo (6ta presentación), no afecta la memoria. **c.** La anisomicina, inyectada de la 4ta a la 6ta presentación, deteriora sólo a la memoria recientemente consolidada. **d.** La anisomicina, aplicada de 6ta a la 8va presentación, no afecta la memoria. Las flechas indican el momento en el cual se inyectó anisomicina (triángulos blancos) o solución vehículo (círculos negros). ** = $p < 0.01$ entre el grupo con anisomicina y el grupo control. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria.

Para analizar con mayor detalle la hipótesis de que la síntesis de proteínas es requerida para actualizar la memoria, esto es, incorporar información relevante a memoria previamente consolidada, se utilizó una tarea de memoria de aversión llamada, condicionamiento de aversión a los sabores (CAS). En esta tarea el sabor (estímulo condicionado) es asociado con malestar gástrico (estímulo incondicionado), inducido por una inyección en el peritoneo de LiCl (0.2M). Como se observa en la figura 7a, se obtiene una clara aversión a un sabor que previamente fue etiquetado como no dañino. Una prueba ANOVA de medidas repetidas mostró interacción de grupo x ensayos ($F(9,126) = 13.12, p < 0.01$). Este resultado muestra que la tarea de aversión se puede aprender para un sabor previamente etiquetado como seguro [62]. Bajo este protocolo se probó si la información actualizada (aversión) es la que requiere de la síntesis de proteínas para mantenerse en la memoria de largo plazo. Por lo tanto se inyectó anisomicina en la corteza insular en la séptima presentación del sabor en la que se realizó, por segunda vez, una asociación entre el sabor y el malestar. El resultado fue que durante la octava presentación del sabor el consumo se incrementó. Sin embargo, para el grupo inyectado con vehículo el consumo se redujo aún más (Figura 7b). Una prueba ANOVA de medidas repetidas indicó interacción de grupo x ensayos ($F(7,56) = 2.89, p < 0.05$). Una prueba *t* reveló diferencias en el consumo en la octava presentación, entre el grupo vehículo y el inyectado con anisomicina ($t(8) = 3.14, p < 0.05$). Esto indica que la anisomicina afectó la información actualizada (aversión), apoyando la idea de que la síntesis de proteínas es necesaria para actualizar un trazo de memoria previamente adquirido.

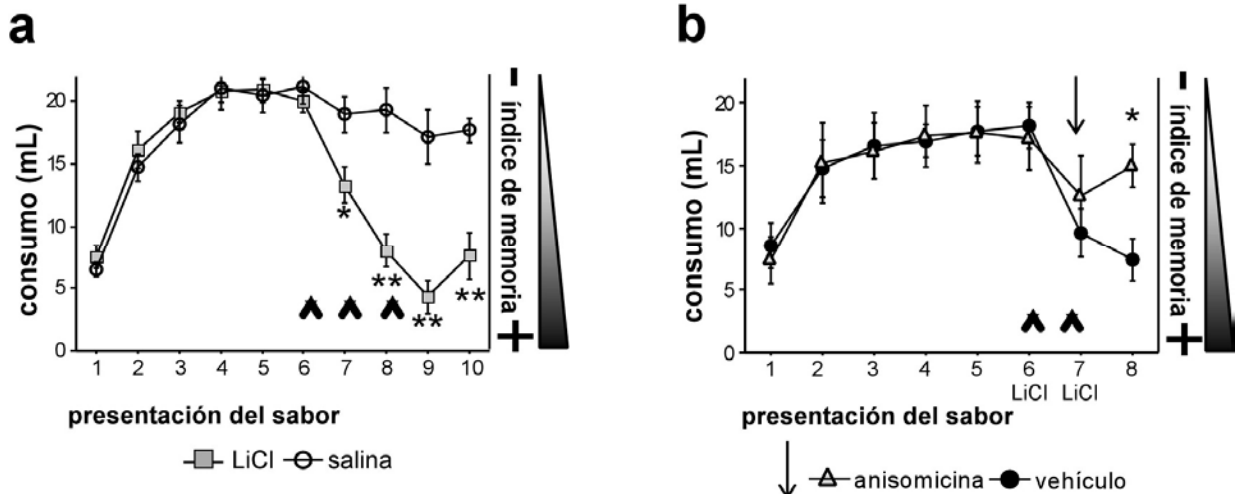


Figura 7. La síntesis de proteínas es necesaria para la actualización de la memoria. **a.** La inyección de LiCl por tres días consecutivos (de la 6ta a la 8va presentación), produce una creciente aversión a un sabor (cuadrados). La aversión no se observa si se inyecta solución salina (círculos). **b.** La anisomicina afecta la información actualizada (aversión). Las cabezas de flecha indican inyección en el peritoneo de LiCl o solución salina. Las flechas indican el momento en el cual se inyectó anisomicina (triángulos blancos) o solución vehículo (círculos negros). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ entre tratamientos. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria.

Estos resultados apoyan la propuesta de que un proceso, dependiente de la síntesis de proteínas, se lleva a cabo mientras se adquiere información actualizada capaz de modificar la conducta. Este proceso permite integrar información actualizada y relevante a un trazo de memoria de largo plazo. Para esto, parte de la memoria previamente consolidada es dependiente de la síntesis de proteínas. Probablemente esta susceptibilidad parcial permite la integración de la información entrante con el trazo previamente consolidado. En concordancia con esta idea, después de que se alcanza la asíntota en el desempeño de la tarea, el trazo de memoria ya no es afectado por la inhibición de la síntesis de proteínas, indicando que en este punto ya no hay más información relevante que ser aprendida.

V.3 Resultados obtenidos en el modelo de memoria espacial

Los datos obtenidos en el modelo de memoria gustativa sugieren que la memoria evocada puede ser modificada como parte de un proceso que permite integrar información actualizada a la memoria de largo plazo. Sin embargo, queda por contestarse si este proceso es particular de la memoria gustativa o un mecanismo compartido por otros tipos de memorias; por lo que se probó esta hipótesis utilizando como modelo de memoria espacial el laberinto acuático de Morris. En esta tarea los animales aprenden la localización de una plataforma dentro de una tina llena con agua. La plataforma no es visible dentro de la tina y se requiere utilizar claves espaciales, dentro del cuarto donde se realiza la tarea, para localizar la plataforma [63,64] (Figura 8a).

Existe una gran cantidad de trabajos que reportan que el hipocampo es una región esencial para el procesamiento de la memoria espacial (Figura 8b) [revisado en 64,65]. Más aún, se ha demostrado que la síntesis de proteínas en el hipocampo es indispensable para la memoria espacial de largo plazo [32,44,66-68]. Además, se ha sugerido que después de su evocación, se requiere de la síntesis de proteínas en el hipocampo para mantener a la memoria espacial en el largo plazo [21,23,48,69]. Por esta razón, se inyectó anisomicina en el hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto acuático, con la intención de explorar el papel que juega la integración de información actualizada en la susceptibilidad que tiene la memoria espacial de ser alterada tras su evocación.

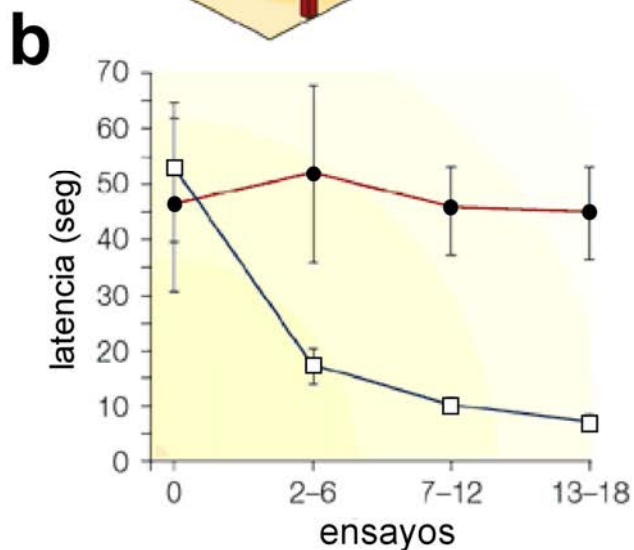
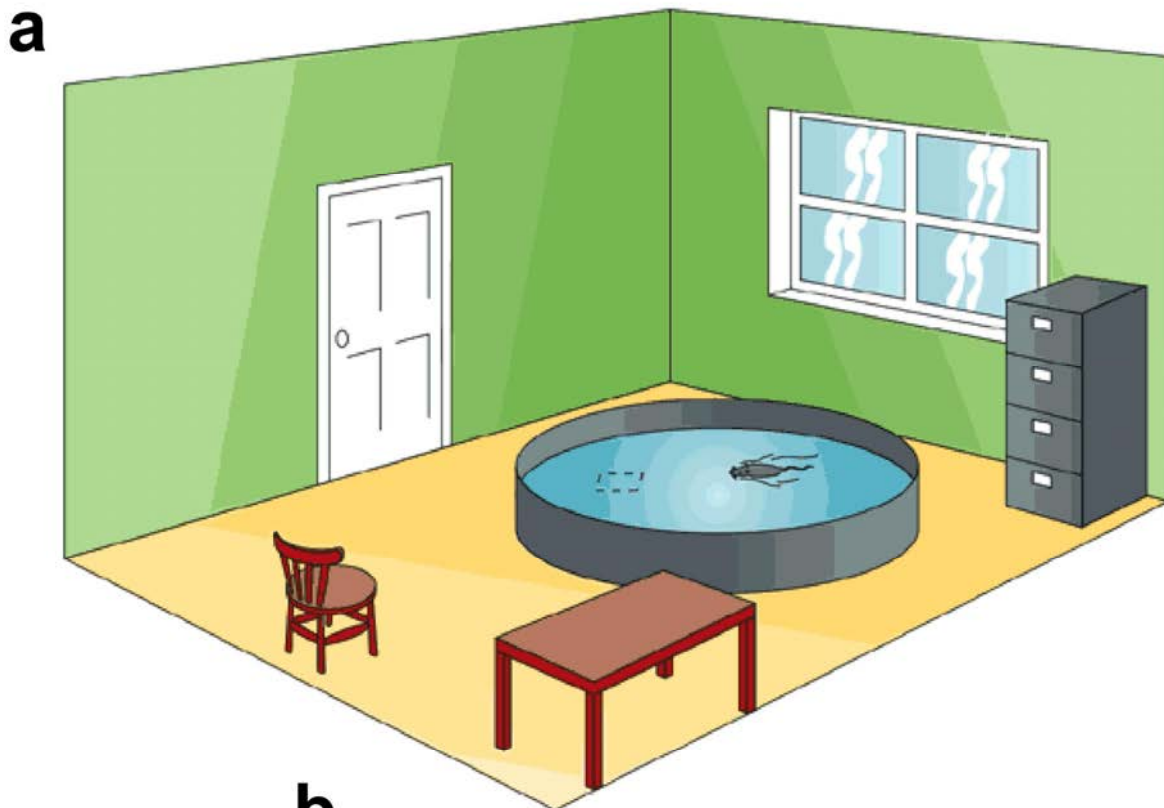


Figura 8. El laberinto acuático de Morris es un modelo de memoria espacial. **a.** Ilustración de un ambiente donde se realiza esta tarea. Se muestran algunas de las claves espaciales típicas que se utilizan. La plataforma está sumergida en el agua y no es visible para la ratita. **b.** Conforme pasan los ensayos, las ratas intactas (cuadrados blancos) tardan menos en llegar a la plataforma. Las ratas con daño en el hipocampo (círculos negros) son incapaces de aprender la tarea (modificado del reporte de Eichenbaum, H. 2000. *Nature Review Neuroscience*, 1:41).

Durante el entrenamiento en el laberinto acuático, al igual que para la tarea de memoria gustativa, se requiere de varios ensayos para alcanzar un desempeño máximo en la ejecución de la tarea. Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de proteínas durante el entrenamiento debe deteriorar la memoria espacial de largo plazo previamente consolidada. Con esta lógica, se entrenaron ratas por cinco días consecutivos y se les inyectó anisomicina 20 min antes del tercer o quinto día de entrenamiento. En las ratas inyectadas en el tercer día de entrenamiento se observó un deterioro en su desempeño durante esa sesión. Una prueba ANOVA de medidas repetidas, para el tercer día de entrenamiento, reveló efecto de grupo ($F(3,30) = 6.86, p < 0.01$) y efecto de ensayos ($F(9,270) = 9.30, p < 0.01$). Una prueba *post-hoc* de Fisher mostró que el grupo con inyección de anisomicina es diferente de su correspondiente grupo control ($p < 0.01$) (Figura 9a, día 3). En el grupo inyectado en el quinto día se obtuvo un efecto similar, pero de menos magnitud. Una prueba ANOVA de medidas repetidas, para el día cinco, mostró efecto solamente de ensayos ($F(9,279) = 4.05, p < 0.01$) y un efecto casi significativo de grupo ($F(3,31) = 2.78, p = 0.057$) (Figura 9a, día 5).

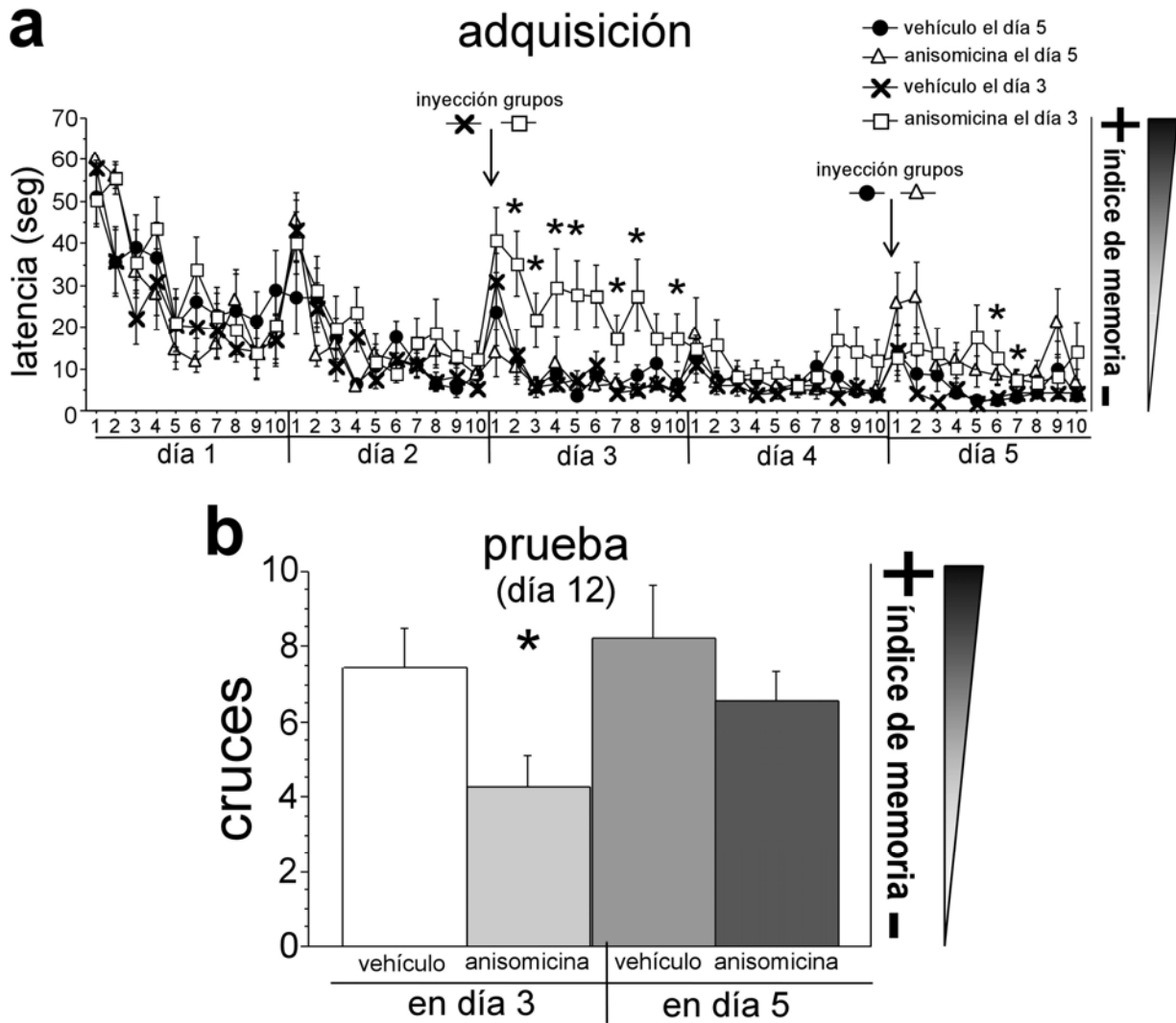


Figura 9. La anisomicina altera la memoria espacial de largo plazo si se aplica en el hipocampo en el tercer día de entrenamiento. **a.** Adquisición de la tarea. Se muestra la latencia promedio \pm error estándar de cada uno de los ensayos (10 por día) durante los 5 días de entrenamiento. **b.** Prueba de memoria de largo plazo 7 días después de la adquisición (día 12). Se muestran los cruces promedio + error estándar por la zona en donde se encontraba la plataforma en el entrenamiento. * = $p < 0.05$ entre anisomicina y su respectivo vehículo. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria.

La anisomicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas ampliamente utilizado en investigación y sus efectos sobre la consolidación de la memoria están bien documentados. Por esta razón, se esperaba efecto sobre la consolidación de la memoria, esto es, un deterioro en el desempeño de la tarea en el día posterior a la inyección y no en el mismo día. Por lo que el resultado obtenido nos indica efectos secundarios de la anisomicina. En otros ámbitos de la investigación, la anisomicina es empleada como agonista de cinasas. En dosis menores a las empleadas en este trabajo, la anisomicina activa las vías de señalización de las cinasas JNK y p38 y como resultado, se da una rápida inducción de genes de expresión temprana [70]. Por lo tanto, el efecto observado podría deberse a una activación inespecífica de estas vías de señalización, que da como resultado, un deterioro en el desempeño solamente durante el día de la inyección. A pesar de esto, la anisomicina debe de producir además, la inhibición de la síntesis de proteínas, evitando el proceso de consolidación que se espera después del entrenamiento. Por esta razón, se realizó una prueba de memoria de largo plazo siete días después de la última sesión de entrenamiento (día 12). En la prueba, se dejó nadar a las ratas por 60 seg en la ausencia de plataforma y, como medida de memoria, se tomó el número de veces que los sujetos cruzaron por donde estaba la plataforma durante el entrenamiento. Como se observa en la gráfica 9b, los animales inyectados con anisomicina en el tercer día de entrenamiento tuvieron un reducido número de cruces en comparación a su control y en comparación a los animales inyectados en el quinto día. Una prueba *t* mostró diferencias entre el grupo con anisomicina en el tercer día y su respectivo grupo control ($t(16) = 2.29, p < 0.05$).

A pesar de que los dos grupos inyectados con anisomicina tuvieron cuatro sesiones de entrenamiento en la ausencia de fármaco, sólo el inyectado en el tercer día tuvo un bajo desempeño en la prueba de memoria siete días después. Este resultado apunta a que el efecto observado en esta prueba de memoria se debe al nivel de entrenamiento que se tenía en el momento de la inyección, esto es, en el tercer día de entrenamiento todavía hay información relevante que ser integrada a la memoria pero no así en el quinto día. Bajo esta lógica, la anisomicina deteriora la memoria de largo plazo cuando es aplicada en el tercer día de entrenamiento porque se necesita, en este punto, de la síntesis de proteínas para actualizar la memoria. Es posible que el efecto observado en la prueba de memoria sea derivado del bajo desempeño observado en el tercer día de entrenamiento, y no a la inhibición de la síntesis de proteínas. Aún así, el efecto en la memoria de largo plazo se observa solamente en los animales inyectados en el tercer día, cuando su desempeño todavía no es asintótico, y no en los inyectados en el quinto día; apoyando la hipótesis de que lo fundamental para que se de este fenómeno es que se adquiriera información capaz de modificar la conducta. Sin embargo, en la siguiente serie de experimentos se intentó aclarar el efecto que tiene la anisomicina en esta tarea.

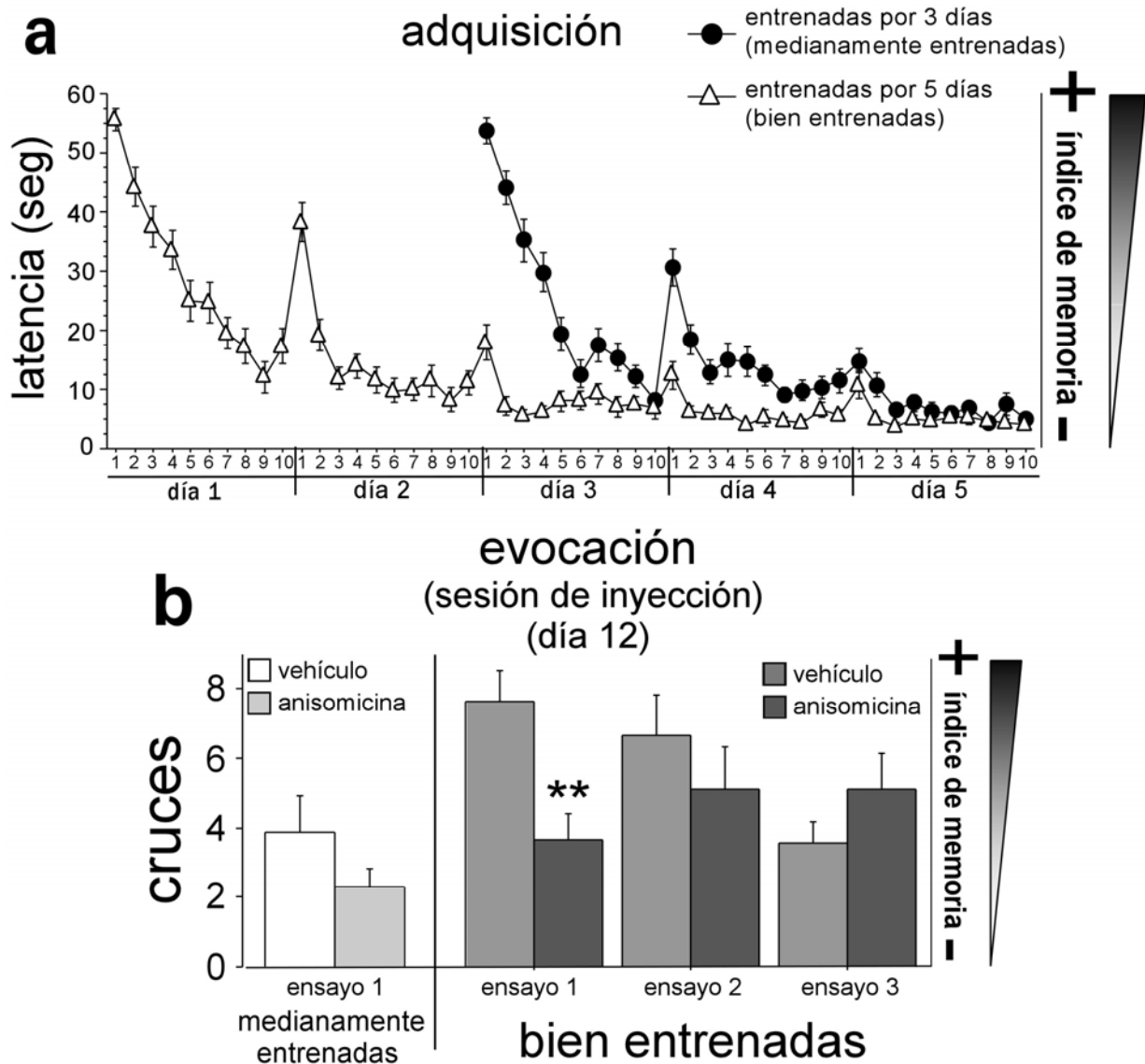


Figura 10. La anisomicina inyectada en el hipocampo durante la sesión de evocación afectó el desempeño de la tarea. **a.** Adquisición de la tarea. Se muestra la latencia promedio \pm error estándar de cada uno de los ensayos (10 por día) durante los 3 o 5 días de entrenamiento. **b.** Sesión de inyección 7 días después de la adquisición (día 12). Se muestran los cruces promedio \pm error estándar por la zona en donde se encontraba la plataforma en el entrenamiento. Cada ensayo consistió de un minuto. ** = $p < 0.01$ entre anisomicina y su respectivo vehículo. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria.

En los experimentos siguientes se entrenaron animales por 3 (medianamente entrenados), o 5 días (bien entrenados) y una semana después se inyectó anisomicina 20 min antes de la sesión de evocación. La prueba de memoria se realizó 7 días después de la evocación. Como se observa en la figura 10a, los animales tienen un desempeño asintótico después de 3 días de entrenamiento. Sin embargo en la evocación, los animales entrenados por 5 días tienen un mucho mejor desempeño (Figura 10b, comparar los grupos vehículo en el ensayo 1). Este resultado demuestra que, el desempeño a largo plazo puede ser mejorado significativamente si se entrena a los sujetos más de 3 días. Consistente con los resultados presentados en la figura 9, se observó una baja en el desempeño en los animales inyectados con anisomicina durante la sesión de evocación (día 12) (Figura 10b). A pesar de este efecto, el grupo entrenado por 3 días, e inyectado con anisomicina, fue el único que presentó un pobre desempeño de la tarea en la prueba de memoria (día 19) (Figura 11a). Una prueba *t* reveló que este grupo es distinto de su vehículo ($t(22) = 2.64, p < 0.05$). Estos resultados apoyan la idea de que la síntesis de proteínas es necesaria para que la memoria evocada permanezca en el almacén de largo plazo, siempre y cuando, se adquiriera información actualizada. Consistentemente, la inyección de anisomicina aplicada a los animales entrenados por 5 días no les produjo un deterioro en la memoria de largo plazo (Figura 11a). Importantemente, la sesión de evocación es indispensable para obtener el efecto de la anisomicina a largo plazo. Animales entrenados por 3 días e inyectados con anisomicina una semana después, en la ausencia de manipulación conductual, se desempeñaron como los animales control en la prueba de memoria (Figura 11b).

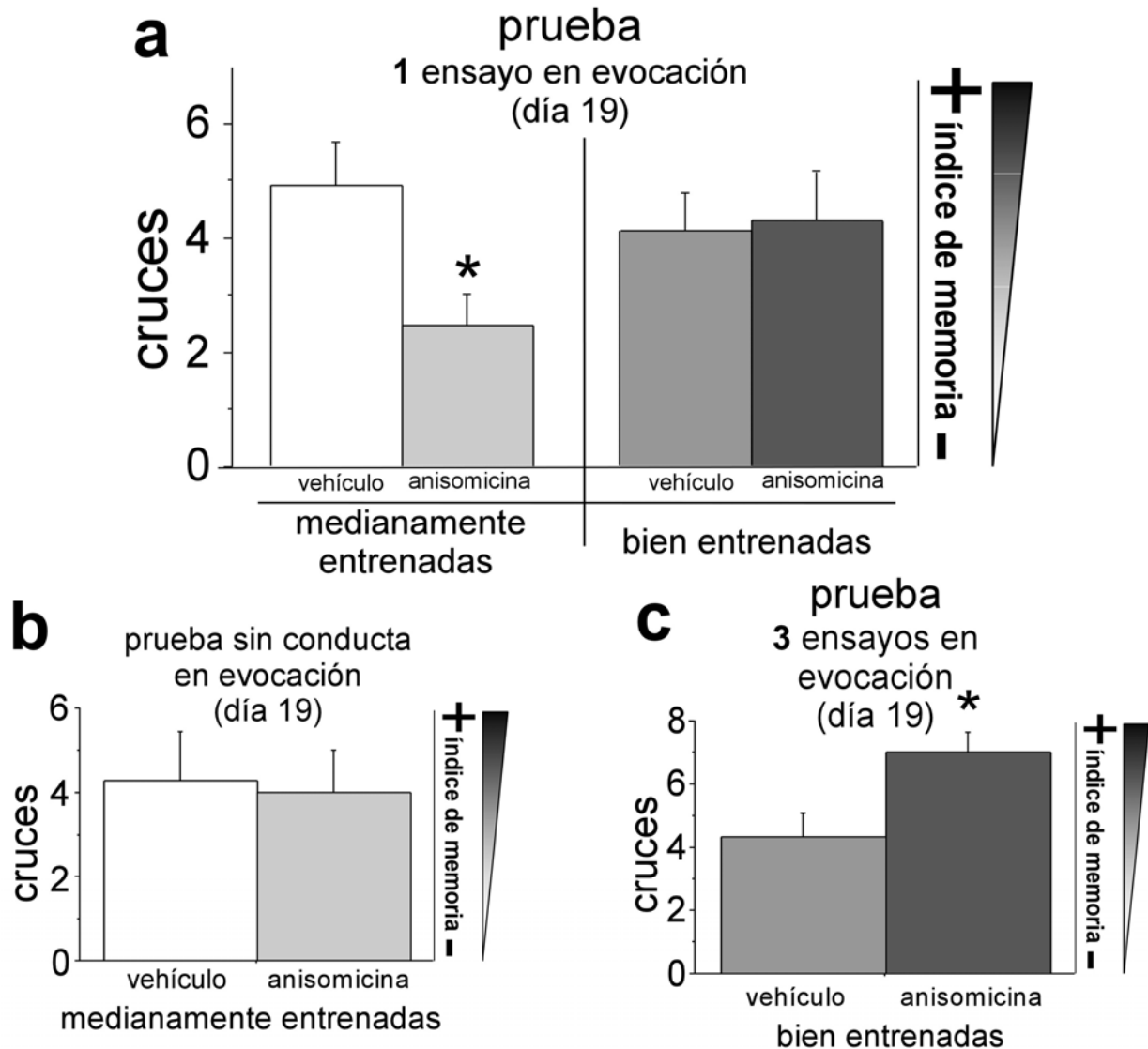


Figura 11. La infusión del inhibidor de la síntesis de proteínas en el hipocampo deteriora a la memoria evocada sólo en los animales medianamente entrenados. **a.** Prueba de memoria de largo plazo 7 días después de la sesión de inyección (día 19) de animales medianamente y bien entrenados. Se muestran los cruces promedio + error estándar por la zona donde se encontraba la plataforma en el entrenamiento. **b.** El efecto que se observa en los animales medianamente entrenados depende de la evocación el día 12. **c.** La extinción de largo plazo se afecta por la inyección de anisomicina si se realiza una sesión de evocación más larga (3 ensayos). * = $p < 0.05$ entre anisomicina y su respectivo vehículo. Para mayor claridad, en el lado derecho de la gráfica se muestra un índice arbitrario de memoria.

Existe evidencia, de Suzuki y colaboradores [36], que indica que las memorias más fuertes requieren de una sesión de evocación más larga para ser afectadas por los inhibidores de la síntesis de proteínas. Para abordar este punto en nuestro protocolo, se aplicó anisomicina a animales bien entrenados durante una sesión de evocación más larga, esto fue, en lugar de un ensayo de 60 seg se realizaron 3 ensayos de 60 seg cada uno. Como se observa en la figura 10b (día 12), los animales inyectados con vehículo extinguen la memoria de la localización de la plataforma y esto se refleja en un menor número de cruces conforme pasan los ensayos. Cuando fueron probados, los animales control tuvieron un pobre desempeño de la tarea (menor número de cruces) en comparación a los animales inyectados con anisomicina (día 19) (Figura 11c). Una prueba *t* mostró diferencias entre vehículo y anisomicina ($t(16) = 2.7, p < 0.05$). Este resultado indica que los animales inyectados con vehículo extinguen la memoria de la localización de la plataforma, mientras que, los inyectados con anisomicina, tienen un deterioro en esta extinción de largo plazo. Este resultado muestra, una vez más, que la inhibición de la síntesis de proteínas evita que la información actualizada sea integrada a un trazo de memoria.

De manera similar a estos resultados, Morris y colegas [71] reportaron recientemente que el desempeño en el laberinto acuático no es afectado por la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo si la tarea ha llegado a la asíntota. Por el contrario, el mismo tratamiento deteriora a la memoria si se adquiere información. En ese trabajo se entrenaron ratas por 6 días en el laberinto acuático con la plataforma en una posición constante. En el día 7, se realizó la sesión de evocación y se inyectó anisomicina. En esas condiciones la anisomicina no tiene efecto sobre la memoria de

largo plazo. Sin embargo, si la plataforma es cambiada de posición durante los 6 días de entrenamiento y se aplica anisomicina en el día 7, manteniendo en ese día la ubicación que tuvo la plataforma en el día 6, se deteriora a la memoria previamente consolidada, esto es, los animales no recuerdan la posición que tuvo la plataforma en el día 6. Los autores de ese trabajo concluyeron que, para observar un deterioro en la memoria previamente consolidada por la inhibición de la síntesis de proteínas es requisito la adquisición de nueva información

.

V.4 Discusión y conclusiones

Así pues, la llamada reconsolidación, parece ser más bien una consolidación de actualización que permite modificar la memoria evocada, mediante un proceso (dependiente de tiempo y de la síntesis de proteínas) que integra información relevante a la memoria de largo plazo. Durante este proceso, la memoria previamente consolidada es parcialmente desestabilizada y, con la infusión de agentes que afectan a la consolidación, parece que el proceso tiene la función de consolidar la memoria otra vez.

La consolidación de actualización podría ser el proceso mediante el cual un trazo de memoria es modificado y estabilizado para dar como resultado un trazo de memoria de largo plazo actualizado. Esta propuesta está basada puramente en el análisis de la conducta y, aunque es claro que la conducta no es un fiel reflejo de la memoria, creo que es posible señalar algunos de los cambios que la consolidación de actualización podría producir en los trazos de memoria tomando como base las observaciones de

este trabajo. En uno de los escenarios más sencillos, hay dos tipos de información que pueden modificar la conducta:

Información convergente con respecto al aprendizaje previo. El ejemplo clásico de esto es, una curva de aprendizaje; en donde con cada ensayo el aprendizaje previo es fortalecido por la adquisición de información con las mismas cualidades. Suponiendo que un ensamble neuronal sea el sustrato físico de una memoria, la información reforzante podría modificar el trazo de memoria previamente consolidado haciendo más fuertes los pesos sinápticos del ensamble existente o agregando unidades (celulares) al ensamble. En cualquiera de los dos casos, se necesitan modificaciones en las unidades celulares del ensamble previamente consolidado.

Utilizando simulación de redes neuronales, Abraham y Robins propusieron que, mientras se aprenden nuevos patrones de secuencia, se requiere de un proceso activo de mantenimiento para preservar los viejos patrones de memoria. En este modelo, la información entrante es incorporada a los viejos patrones, y para esto, se requiere que los viejos patrones sean reforzados parcialmente, de no ser así, son olvidados. Es importante notar que, en esta simulación se necesita de modificaciones en los pesos sinápticos del ensamble para poder mantener la información previamente almacenada mientras se aprende lo nuevo [72]. La consolidación de actualización es el posible mecanismo mediante el cual se podrían dar dichas modificaciones al ensamble. Cuando se realiza la inhibición de la síntesis de proteínas, el proceso de consolidación de actualización se detecta como un deterioro parcial de la información previamente consolidada. Este efecto es menos notorio

conforme la manipulación se realice más cerca de la asíntota conductual, hasta llegar al punto en donde no se adquiere información y el inhibidor no tiene efecto sobre la memoria.

Además de poder ser deteriorada, la memoria previamente consolidada puede ser fortalecida por manipulaciones farmacológicas tras su evocación. En este sentido, Frenkel y colaboradores reportaron modulación positiva de una memoria evocada utilizando como modelo animal al cangrejo [73]. Ellos mostraron que, tras la evocación, una memoria puede ser fortalecida por un mecanismo endógeno que es modulado por el péptido angiotensina II. Aunque la regulación positiva de las memorias evocadas había sido previamente reportada [74, revisado en 14,15], el estudio de Frenkel y colegas fue realizado con el objetivo de proveer información que ayudara a explicar la función de la reconsolidación; razón por la cual llegan a la conclusión, en congruencia con la propuesta de la consolidación de actualización, de que la reconsolidación es un proceso que permite modificar la fuerza de un trazo de memoria. Más evidencia a este respecto ha sido obtenida en experimentos realizados en pollos por Summers y colaboradores [75]. Ellos también sugieren que la evocación de la memoria inicia un proceso que permite la integración de la información adquirida durante la evocación a la memoria de largo plazo. Sin embargo, en el trabajo de Summers se reporta que la memoria evocada puede ser modificada mientras no haya sido consolidada. Este trabajo indica que, en pollos, el proceso que permite la modificación de la memoria probablemente está limitado a la memoria de corto plazo. Este no es el caso en ratas, donde la memoria puede ser modificada después de su consolidación como indican los datos descritos en esta tesis.

Información divergente con respecto al aprendizaje previo. En este caso se incorpora a la memoria previamente consolidada, información relacionada pero con otras características. Por ejemplo, se puede aprender aversión al mismo sabor que ha sido previamente etiquetado como un estímulo que no es dañino [62]. Como cualquier otro trazo de memoria, la memoria de aversión adquirida para un sabor seguro requiere de un proceso dependiente de la síntesis de proteínas para ser almacenado en el largo plazo. Una de las posibilidades para que se integre la información divergente es que el ensamble previamente consolidado sufra de modificaciones mayores que cuando se adquiere información reforzante. Por el otro lado, la información divergente podría ser almacenada en otro ensamble que se mezcla con el previamente consolidado. En cualquier caso, una vez más son indispensables las modificaciones en los pesos sinápticos del ensamble previamente consolidado. En este modelo se presume que los trazos se mezclan porque representan a un estímulo en común (en este ejemplo, el sabor) asociado a estímulos divergentes (en este caso la presencia o ausencia de aversión). Siguiendo con el mismo ejemplo, se observa que se produce una menor aversión a un sabor previamente etiquetado como seguro que al mismo sabor cuando no ha sido previamente experimentado. Este resultado podría ser un reflejo conductual de la interacción entre los ensambles. Cuando la única memoria es de aversión, el desempeño en esta conducta es mejor que cuando existe la asociación del sabor con estímulos divergentes que compiten por expresarse en la conducta. De este razonamiento surge la propuesta de que las memorias se mezclan y de que no son independientes entre sí. El grado de fusión entre los trazos estaría determinado por la

cantidad de información que comparten. Esta idea es coherente con las teorías que intentan explicar la incorporación de experiencias recientes al conocimiento general almacenado en el largo plazo [76-78].

La extinción es una más de las posibilidades en que la memoria podría ser actualizada con información divergente. La extinción es un aprendizaje relacionado a la asociación entre los estímulos condicionado e incondicionado y se refleja como un cambio en la conducta cuando el estímulo condicionado es presentado. Consistente con la hipótesis de la consolidación de actualización, la memoria de la asociación entre los estímulos condicionado e incondicionado no se olvida o borra cuando se extingue [79]. La actualización de una memoria incorpora aprendizaje relacionado al aprendizaje previo. El aprendizaje relacionado se refleja en la conducta y el aprendizaje previo no es borrado [80]. A favor de esta propuesta se han reportado características en común entre la memoria de un condicionamiento que ha sido extinto y una memoria que ha sido alterada tras su evocación, como la recuperación espontánea. En este sentido, Eisenberg y Dudai [38] encontraron que la memoria de un condicionamiento, deteriorada después de su evocación, se recupera con la presentación del estímulo incondicionado. De manera similar, se reportó que la memoria de condicionamiento a un contexto se recupera espontáneamente después de 21 días [81]. En un modelo semejante de condicionamiento a un contexto, Power y colaboradores [82] observaron recuperación espontánea del condicionamiento en tiempos cercanos a la adquisición y, Prado-Alcalá y colegas [83] reportaron, en la misma tarea, que varias sesiones de evocación causan la recuperación total del condicionamiento previamente afectado con inyecciones intracerebrales de

tetrodotoxina, un inhibidor de un grupo de canales de sodio. Estos resultados indican que la interrupción del proceso, conocido como reconsolidación, no elimina la memoria previamente consolidada, sino que interfiere con el proceso de consolidación de actualización que integra aprendizajes relacionados. El resultado de este proceso es la estabilización de trazos fusionados. La relación entre los trazos fusionados será lo que determine la conducta.

En conclusión, el presente trabajo ofrece evidencia a favor de la hipótesis de que la reconsolidación es un proceso de consolidación de actualización. La evocación de un trazo de memoria previamente consolidado parece ser una oportunidad para integrar información relevante y actualizada a la memoria de largo plazo, mediante este proceso que toma tiempo y que depende de la síntesis de proteínas.

Capítulo VI Bibliografía

1. Lechner, H.A., Squire, L.R., Byrne, J.H., 1999, 100 years of consolidation--remembering Muller and Pilzecker: *Learn Mem.* **6**, p. 77-87.
2. McGaugh, J.L., 1966, Time-dependent processes in memory storage: *Science.* **153**, p. 1351-1358.
3. McGaugh, J.L., 2000, Memory--a century of consolidation: *Science.* **287**, p. 248-251.
4. Hebb, D.O. 1949. *The Organization of Behavior*, New York, John Wiley & Sons.
5. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., New York, Garland Science. Taylor and Francis group.
6. Lewin, B. 2004. *Genes VIII*, Upper Saddle River, N.J., Pearson Education, Inc. Pearson Prentice Hall.
7. Davis, H.P., Squire, L.R., 1984, Protein synthesis and memory: a review: *Psychol Bull.* **96**, p. 518-559.
8. Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S., Kandel, E.R., 1986, The long and the short of long-term memory--a molecular framework: *Nature.* **322**, p. 419-422.
9. Kandel, E.R., 2001, The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses: *Science.* **294**, p. 1030-1038.
10. Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J., 1968, Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace: *Science.* **160**, p. 554-555.
11. Dawson, R.G., McGaugh, J.L., 1969, Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: further examination: *Science.* **166**, p. 525-527.
12. Gordon, W.C., 1977, Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon: *Physiol Behav.* **18**, p. 95-99.
13. Lewis, D.J., 1979, Psychobiology of active and inactive memory: *Psychol.Bull.* **86**, p. 1054-1083.
14. Sara, S.J., 2000, Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering: *Learn Mem.* **7**, p. 73-84.
15. Nader, K., 2003, Memory traces unbound: *Trends Neurosci.* **26**, p. 65-72.
16. Bucherelli, C., Tassoni, G., 1992, Engram activation reinstates the susceptibility of consolidated memory traces to retrograde amnesia by functional blockade of parabrachial nuclei: *Behav Brain Res.* **51**, p. 61-65.
17. Przybylski, J., Sara, S.J., 1997, Reconsolidation of memory after its reactivation: *Behav Brain Res.* **84**, p. 241-246.
18. Roullet, P., Sara, S., 1998, Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase: *Neural Plast.* **6**, p. 63-68.
19. Przybylski, J., Roullet, P., Sara, S.J., 1999, Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors: *J Neurosci.* **19**, p. 6623-6628.
20. Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2000, Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval: *Nature.* **406**, p. 722-726.
21. Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J., 2001, Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories: *J Neurosci.* **21**, p. 2186-2193.
22. Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M., Maldonado, H., 2002, Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors: *J Neurosci.* **22**, p. 8305-8311.
23. Debiec, J., LeDoux, J.E., Nader, K., 2002, Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus: *Neuron.* **36**, p. 527-538.
24. Sangha, S., Scheibenstock, A., Lukowiak, K., 2003, Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1: *J Neurosci.* **23**, p. 8034-8040.
25. Child, F.M., Epstein, H.T., Kuzirian, A.M., Alkon, D.L., 2003, Memory reconsolidation in *Hermisenda*: *Biol.Bull.* **205**, p. 218-219.
26. Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D.E., Dudai, Y., 2003, Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance: *Science.* **301**, p. 1102-1104.

27. Walker, M.P., Brakefield, T., Hobson, J.A., Stickgold, R., 2003, Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation: *Nature*. **425**, p. 616-620.
28. Kelly, A., Laroche, S., Davis, S., 2003, Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory: *J Neurosci*. **23**, p. 5354-5360.
29. Salinska, E., Bourne, R.C., Rose, S.P., 2004, Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task: *Eur.J Neurosci*. **19**, p. 3042-3047.
30. Wang, S.H., Ostlund, S.B., Nader, K., Balleine, B.W., 2005, Consolidation and reconsolidation of incentive learning in the amygdala: *J Neurosci*. **25**, p. 830-835.
31. Berman, D.E., Dudai, Y., 2001, Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex: *Science*. **291**, p. 2417-2419.
32. Vianna, M.R.M., Szapiro, G., McGaugh, J.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2001, Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**, p. 12251-12254.
33. Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2004, Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory: *Learn Mem*. **11**, p. 572-578.
34. Izquierdo, I., Cammarota, M., Vianna, M.M., Bevilaqua, L.R., 2004, The inhibition of acquired fear: *Neurotox.Res.* **6**, p. 175-188.
35. Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2003, Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration: *Neuron*. **38**, p. 863-869.
36. Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., Kida, S., 2004, Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures: *J Neurosci*. **24**, p. 4787-4795.
37. Milekic, M.H., Alberini, C.M., 2002, Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation: *Neuron*. **36**, p. 521-525.
38. Eisenberg, M., Dudai, Y., 2004, Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die: *Eur.J Neurosci*. **20**, p. 3397-3403.
39. Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J., 2001, Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala: *Eur.J Neurosci*. **13**, p. 1453-1458.
40. Kida, S., Josselyn, S.A., de Ortiz, S.P., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S., Silva, A.J., 2002, CREB required for the stability of new and reactivated fear memories: *Nat Neurosci*. **5**, p. 348-355.
41. Bozon, B., Davis, S., Laroche, S., 2003, A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval: *Neuron*. **40**, p. 695-701.
42. Merlo, E., Freudenthal, R., Maldonado, H., Romano, A., 2005, Activation of the transcription factor NF-kappaB by retrieval is required for long-term memory reconsolidation: *Learn Mem*. **12**, p. 23-29.
43. Duvarci, S., Nader, K., LeDoux, J.E., 2005, Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning: *Eur.J Neurosci*. **21**, p. 283-289.
44. Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B., Alberini, C.M., 2001, The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta: *Nat Neurosci*. **4**, p. 813-818.
45. Tronel, S., Sara, S.J., 2002, Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval: *Learn Mem*. **9**, p. 105-111.
46. Gutierrez, R., Tellez, L.A., Bermudez-Rattoni, F., 2003, Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar: *Eur J Neurosci*. **17**, p. 1556-1562.
47. Bahar, A., Samuel, A., Hazvi, S., Dudai, Y., 2003, The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it: *Eur.J Neurosci*. **17**, p. 1527-1530.
48. Lee, J.L.C., Everitt, B.J., Thomas, K.L., 2004, Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation: *Science*. **304**, p. 839-843.
49. Duvarci, S., Nader, K., 2004, Characterization of fear memory reconsolidation: *J Neurosci*. **24**, p. 9269-9275.
50. Alberini, C.M., 2005, Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?: *Trends Neurosci*. **28**, p. 51-56.
51. Domjan, M., 1977, *Attenuation and enhancement of neophobia for edible substances*, en Barker Lewis M, Best Michael R, y Domjan Michael (eds), Learning mechanisms in food selection: USA,

- Baylor university press, p. 151-180.
52. Buresova O, Bures J, 1980, Post-ingestion interference with brain function prevents attenuation of neophobia in rats: *Behav Brain Res.* **1**, p. 299-312.
 53. Vos-Korthals, W.H., van Hof, M.W., 1984, The effect of hypobaric hypoxia on taste neophobia in rats: *Behav.Brain Res.* **14**, p. 157-159.
 54. Dogterom, G.J., van Hof, M.W., 1988, Attenuation of neophobia and conditioned taste aversion in the rabbit: *Behav.Brain Res.* **28**, p. 253-257.
 55. Bermudez-Rattoni, F., 2004, Molecular mechanisms of taste-recognition memory: *Nat Rev Neurosci.* **5**, p. 209-217.
 56. Rosenblum, K., Meiri, N., Dudai, Y., 1993, Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex: *Behav.Neural Biol.* **59**, p. 49-56.
 57. Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C.J., De, I.C., V, Nunez-Jaramillo, L., Bermudez-Rattoni, F., 2003, Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes: *Neurobiol.Learn.Mem.* **80**, p. 323-331.
 58. Miranda, M.I., Bermudez-Rattoni, F., 1999, Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, p. 6478-6482.
 59. Rosenblum, K., Futter, M., Jones, M., Hulme, E.C., Bliss, T.V., 2000, ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons: *J.Neurosci.* **20**, p. 977-985.
 60. Berman, D.E., Hazvi, S., Neduva, V., Dudai, Y., 2000, The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace: *J.Neurosci.* **20**, p. 7017-7023.
 61. Domjan, M., 1976, Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure: *J.Exp.Psychol.Anim Behav.Process.* **2**, p. 17-27.
 62. Bures, J., Bermudez-Rattoni, F., Yamamoto, T. 1998. Conditioned taste aversion: memory of a special kind, New York, Oxford science publications.
 63. Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982, Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions: *Nature.* **297**, p. 681-683.
 64. Eichenbaum, H., 2000, A cortical-hippocampal system for declarative memory: *Nat.Rev.Neurosci.* **1**, p. 41-50.
 65. Squire, L.R., Stark, C.E., Clark, R.E., 2004, The medial temporal lobe: *Annu.Rev.Neurosci.* **27**, p. 279-306.
 66. Guzowski, J.F., McGaugh, J.L., 1997, Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, p. 2693-2698.
 67. Igaz, L.M., Vianna, M.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2002, Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning: *J.Neurosci.* **22**, p. 6781-6789.
 68. Naghdi, N., Majlessi, N., Bozorgmehr, T., 2003, The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus: *Behav.Brain Res.* **139**, p. 69-73.
 69. von Herten, L.S., Giese, K.P., 2005, Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation: *J.Neurosci.* **25**, p. 1935-1942.
 70. Hazzalin, C.A., Le Panse, R., Cano, E., Mahadevan, L.C., 1998, Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction: *Mol.Cell Biol.* **18**, p. 1844-1854.
 71. Morris, R.G., Inglis, J., Ainge, J.A., Olverman, H.J., Tulloch, J., Dudai, Y., Kelly, P.A., 2006, Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval: *Neuron.* **50**, p. 479-489.
 72. Abraham, W.C., Robins, A., 2005, Memory retention--the synaptic stability versus plasticity dilemma: *Trends Neurosci.* **28**, p. 73-78.
 73. Frenkel, L., Maldonado, H., Delorenzi, A., 2005, Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II: *Eur.J Neurosci.* **22**, p. 1757-1766.
 74. Gordon, W.C., Spear, N.E., 1973, Effect of reactivation of a previously acquired memory on the interaction between memories in the rat: *J Exp.Psychol.* **99**, p. 349-355.

75. Summers, M.J., Crowe, S.F., Ng, K.T., 2000, Modification of a weak learning experience by memory retrieval in the day-old chick: *Behav.Neurosci.* **114**, p. 713-719.
76. Marr, D., 1971, Simple memory: a theory for archicortex: *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **262**, p. 23-81.
77. Sutherland, G.R., McNaughton, B., 2000, Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles: *Curr.Opin.Neurobiol.* **10**, p. 180-186.
78. Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005, The organization of recent and remote memories: *Nat.Rev.Neurosci.* **6**, p. 119-130.
79. Bouton, M.E., 2004, Context and behavioral processes in extinction: *Learn Mem.* **11**, p. 485-494.
80. Rodriguez-Ortiz, C.J., De la Cruz, V., Gutierrez, R., Bermudez-Rattoni, F., 2005, Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained: *Learn Mem.* **12**, p. 533-537.
81. Lattal, K.M., Abel, T., 2004, Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time: *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* **101**, p. 4667-4672.
82. Power, A.E., Berlau, D.J., McGaugh, J.L., Steward, O., 2006, Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of re-exposure duration: *Learn Mem.* **13**, p. 27-34.
83. Prado-Alcala, R.A., Diaz del Guante, M.A., Garin-Aguilar, M.E., Diaz-Trujillo, A., Quirarte, G.L., McGaugh, J.L., 2006, Amygdala or hippocampus inactivation after retrieval induces temporary memory deficit: *Neurobiol Learn Mem.* **86**, p. 144-149.
84. Paxinos, G., Watson, C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates, San Diego, Academic Press.
85. Barondes, S.H., Cohen, H.D., 1967, Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory in mice: *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* **58**, p. 157-164.

Capítulo VII Apéndices

VII.1 Material y métodos

Animales

Para este trabajo se usaron ratas macho de la cepa *Wistar* que en el momento de la cirugía tenían un peso de entre 280 y 320 g. Se mantuvieron en jaulas individuales dentro de un cuarto con ciclo controlado de 12 hrs luz y 12 hrs oscuridad. Tuvieron acceso a agua y comida sin restricción. En el caso de los experimentos realizados en el modelo de memoria gustativa se restringió el acceso a agua al inicio del protocolo experimental.

Cirugía e inyección

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (65 mg/kg) o ketamina/xilazina (20/2 mg). Se les implantó una cánula en cada hemisferio en la región de la corteza insular o el hipocampo. La cánula quedó fija al cráneo con dos tornillos y cemento dental en las coordenadas (mm): insular, anterior 1.2, lateral \pm 5.5 y ventral 4; hipocampo, posterior 3.6, lateral \pm 3, y ventral 2.3 (con respecto a bregma [84]). Para administrar los fármacos se colocó un inyector que sobresalía por 1 (hipocampo) o 2 mm (insular) de las cánulas y se difundió un μ L de líquido. El líquido se difundió en un min y se dejó el inyector en esa posición por un min adicional para permitir la completa difusión del fármaco. Las ratas fueron manipuladas por varios días antes del día de la inyección para prevenir el estrés.

Fármacos

A la anisomicina (100mg/mL) se le agregó una cantidad equimolar de HCl y se disolvió en solución vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial (mM): NaCl 125, KCl 5, NaH₂PO₄.H₂O 1.25, MgSO₄.7H₂O 1.5, NaHCO₃ 26, glucosa 10, CaCl₂ 2.5), pH •7.4.

Protocolos experimentales utilizados en el modelo de memoria gustativa

Neofobia y atenuación de la neofobia (AN). Después de un periodo de por lo menos 5 días después de la cirugía, las ratas fueron privadas de agua por 24 hrs. Después se les dio acceso a agua una vez al día durante 3 días consecutivos. En el día 4 se realizó el ensayo de neofobia, las ratas recibieron una solución de sacarina al 0.3% (w/v) por primera vez. A menos que se especifique de otra manera, en los días siguientes las ratas recibieron, una vez al día, la solución de sacarina para evaluar la conducta de AN. Para evitar la deshidratación de los animales se les dio acceso a agua después de cada consumo de sacarina. Todos los periodos de consumo fueron por 15 min y el volumen consumido fue registrado. Salvo en los experimentos presentados en la figura 7 (ver abajo), las inyecciones se aplicaron inmediatamente después del consumo de sacarina (o de agua para la figura 5a, inserto) en el momento especificado en cada experimento.

En el experimento presentado en la figura 7a se inyectó LiCl en el peritoneo (0.2 M, 10 mL/Kg) o el equivalente en volumen de solución salina (0.9%), 15 min después de terminado el consumo de sacarina, de la 6ta. a la 8va. presentación.

En el experimento presentado en la figura 7b se inyectó LiCl en el peritoneo (0.2 M, 10 mL/Kg), 15 min después de terminado el consumo de sacarina, en la 6ta y 7ma presentación.

La inyección en la corteza insular se realizó 15 min antes del consumo de sacarina en la 7ma presentación.

Protocolos experimentales utilizados en el modelo de memoria espacial

Entrenamiento en el laberinto acuático de Morris. La tarea se llevó a cabo en un tanque circular de 1.5 m de diámetro y 1 m de altura. El tanque se llenó con agua y se colocó en un cuarto con claves espaciales en las paredes. Una plataforma de 15x15 cm fue colocada 1 cm por debajo del nivel del agua. Cada sesión de entrenamiento consistió de 10 ensayos. En cada ensayo se colocó a la rata en el tanque en uno de los 10 diferentes sitios de inicio y se dejó que nadara por 60 seg o hasta que llegara a la plataforma. Las ratas se quedaron en la plataforma por 30 seg y después por otros 30 seg en una caja. En seguida comenzó otro ensayo. A las ratas que no llegaron a la plataforma en 60 seg se les ayudó a llegar guiándolas con la mano.

Inyecciones en el hipocampo durante el entrenamiento (Figura 9). Las ratas fueron entrenadas en el laberinto por 5 días consecutivos e inyectadas con vehículo o anisomicina 20 min antes del inicio de la 3ra o 5ta sesión de entrenamiento. La prueba de memoria de largo plazo se realizó 7 días después de terminado el entrenamiento (día 12). Durante la sesión de prueba se dejó nadar a las ratas por 60 seg en la ausencia de plataforma.

Inyecciones en el hipocampo en la sesión de evocación (Figuras 10 y 11). Las ratas fueron entrenadas en el laberinto por 3 o 5 días consecutivos. 7 días después del término del entrenamiento, las ratas fueron inyectadas con vehículo o anisomicina 20 min antes del inicio de la sesión de evocación (día 12). Durante la sesión de evocación, los animales nadaron por 60 seg en la ausencia de plataforma. Después de ese tiempo se colocó la plataforma en el lugar que ocupó durante el entrenamiento y se dejó que las ratas nadaran por otros 60 seg o hasta que llegaron a la plataforma. Las ratas se quedaron en la plataforma por 30 seg para evitar la extinción. A las ratas que no llegaron a la plataforma en 60 seg se les ayudó a llegar guiándolas con la mano. En los grupos que no tuvieron sesión de evocación (Figura 11b) se realizó la inyección 7 días después de finalizado el entrenamiento (día 12) en un cuarto distinto y no tuvieron más manipulaciones hasta la sesión de prueba. Los grupos que presentaron extinción (Figura 11c) realizaron 3 ensayos en la sesión de evocación (día 12). En cada ensayo los animales nadaron por 60 seg en la ausencia de plataforma, descansando por 30 seg en una caja entre los ensayos. Todas las ratas tuvieron su sesión de prueba de largo plazo 14 días después del término del entrenamiento (día 19). Durante la sesión de prueba se dejó nadar a las ratas por 60 seg en la ausencia de plataforma.

Histología

Al final de los experimentos se aplicó una sobredosis de pentobarbital a los animales y se perfundieron con solución salina. Los cerebros fueron colocados en solución fijadora: paraformaldehído al 4% (w/v) disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1M (PB, por sus siglas en inglés), pH •7.4. Pasadas 24 hrs, los cerebros fueron transferidos a una solución de sacarosa al 30% (w/v) disuelta en PB y guardados a 4°C hasta que fueron cortados. Se obtuvieron cortes coronales de 40 µm y se tiñeron con el colorante violeta de cresilio. Los cortes fueron examinados al microscopio para observar los trayectos de los inyectores y la localización de las cánulas.

Análisis de los datos obtenidos en el modelo de memoria espacial

Los experimentos fueron grabados en video utilizando el sistema de seguimiento de trayectos llamado *chromotrack*. Las latencias de llegada a la plataforma fueron utilizadas como medida de aprendizaje durante el entrenamiento. En las sesiones de evocación y prueba, se utilizó

como medida de memoria el número de cruces que tuvo cada animal por la zona donde se encontraba la plataforma en el entrenamiento. Además, se evaluó la velocidad de nado promedio para descartar efectos de los fármacos sobre la actividad motora.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para comparar los promedios \pm error estándar de los consumos a lo largo de los ensayos o, de las latencias entre grupos a lo largo de los ensayos en un día particular. El análisis *post-hoc* de Fisher se utilizó para determinar diferencias entre tratamientos o ensayos. La prueba *t-student* se usó para comparar los consumos o número de cruces entre 2 grupos en un ensayo particular. Una probabilidad menor a 0.05 fue el límite fijado para considerar diferencias significativas.

VII.2 Publicaciones derivadas de este proyecto

Rodriguez-Ortiz C.J., De la Cruz V., Gutierrez R., Bermudez-Rattoni F., 2005, Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn. Mem.* **12**, p. 533-537.

Rodriguez-Ortiz C.J., Bermudez-Rattoni F., 2007, *Memory reconsolidation or updating consolidation?*, en Bermudez-Rattoni F. (ed), Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging. Taylor & Francis group, Florida. p. 209-224.

Research

Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained

Carlos J. Rodriguez-Ortiz, Vanesa De la Cruz, Ranier Gutiérrez, and Federico Bermudez-Rattoni¹

Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México

Consolidation theory proposes that through the synthesis of new proteins recently acquired memories are strengthened over time into a stable long-term memory trace. However, evidence has accumulated suggesting that retrieved memory is susceptible to disruption, seeming to consolidate again (reconsolidate) to be retained in long-term storage. Here we show that intracortical blockade of protein synthesis in the gustatory cortex after retrieval of taste-recognition memory disrupts previously consolidated memory to a restricted degree only if the experience is updated. Our results suggest that retrieved memory can be modified as part of a mechanism for incorporating updated information into previously consolidated memory.

The memory consolidation hypothesis has been the major theoretical framework to explain long-term memory storage (McGaugh 1966, 2000). However, it has been reported that memory activated by retrieval becomes susceptible to disruption by the same means that disrupt consolidation (Misanin et al. 1968; Nader et al. 2000). This process, called reconsolidation, suggests that consolidated memory returns to a labile state similar to recently acquired memory each time it is retrieved (Sara 2000; Debiec et al. 2002). However, most of the studies in which reconsolidation process is achieved have used associative learning tasks requiring the association between a conditioned stimulus (CS) and an unconditioned stimulus (US) followed by extinction trials in which the CS is no longer followed by the US. Therefore, during retrieval, when reconsolidation is assessed, there is a competition between the extinction (CS–noUS) and the associative (CS–US) traces, which both require protein synthesis to be retained in long-term memory (Eisenberg et al. 2003; Pedreira and Maldonado 2003). Here we address the post-retrieval consolidation issue on a taste-recognition memory task that allows us to access the formation of memory in the absence of extinction. That is, we used a CS with the same valence during acquisition and retrieval so extinction does not occur and a competition between memories is not established.

Animals exposed to novel taste show reduced consumption (neophobic response). This is followed by graded increases in intake after repeated presentations of the same tastant until a plateau is reached. This behavior is called attenuation of neophobia or AN (Domjan 1977; Buresova and Bures 1980; de Vos-Korthals and van Hof 1984; Dogterom and van Hof 1988; Bermudez-Rattoni 2004). AN is a long-lasting behavior in which animals must remember a taste as having been experienced previously. This kind of memory is referred as taste-recognition memory (Bermudez-Rattoni 2004), and the insular cortex (IC) (the gustatory neocortex) has been proven to be an important site of gustatory memory formation (Rosenblum et al. 1993;

Gutierrez et al. 2003a,b; Bermudez-Rattoni 2004). In AN, the animal exposed to a particular taste will drink more of that solution regardless of the time elapsed between two consecutive taste presentations (Domjan 1976).

Although intracellular pathways for taste memory consolidation (e.g., ERK1/2 and the transcription factor Elk-1; Berman et al. 1998; Berman 2003) have been identified, there is no evidence that cortical protein synthesis is required for long-term AN. Moreover, it has been suggested that after consolidation, retrieval induces a protein-synthesis-dependent process to retain the memory trace in long-term storage (Misanin et al. 1968; Nader et al. 2000; Debiec et al. 2002; Pedreira et al. 2002; Eisenberg et al. 2003). Should this be the case, then a blockade of protein synthesis after retrieval should disrupt the memory trace. Therefore, the aim of this study was to address this important issue, by using a taste-recognition memory task and injecting anisomycin—a translation inhibitor—infused into the insular cortex under conditions that effectively inhibit >90% of protein synthesis in this region (Rosenblum et al. 1993).

Results

Histological analysis revealed that anisomycin was injected in the IC (Fig. 1). As seen in Figure 2B, animals who received an anisomycin injection into the IC immediately after their first taste presentation (0.3% saccharin) did not exhibit AN on the following day, because their second consumption was similar to their first intake. Injections of artificial cerebrospinal fluid (ACSF) had no effect on AN. The effect of anisomycin was temporal, as increased intake to plateau was observed for succeeding presentations. In addition, when anisomycin was administered 24 h after the first taste presentation, no effect on AN was observed, indicating that protein synthesis is not required for AN consolidation after 24 h (Fig. 2B, inset). A repeated measures analysis of variance (ANOVA) revealed a significant effect of group ($F_{(2,21)} = 14.7, p < 0.01$), an effect of trials ($F_{(4,84)} = 100.23, p < 0.01$), and a group \times trials interaction ($F_{(8,84)} = 4.80, p < 0.01$). Fisher's post-hoc test revealed that the group injected immediately after the first taste presentation was different from the vehicle group and from the group injected 24 h after

¹Corresponding author.

E-mail fbermude@ifc.unam.mx; fax (5255) 56 22 56 07.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.94505>.

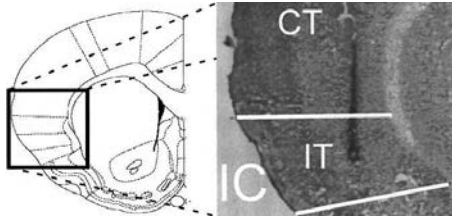


Figure 1. Selected microphotography of a coronal section of an anisomycin-injected rat showing cannula track (CT) and injector tip (IT) location in the insular cortex (IC). Similar results were observed for the rest of the implanted animals. On the left is a coronal diagram of the IC (Reprinted with permission from Elsevier © 1998, Paxinos and Watson 1998).

($p < 0.01$). These results indicate that long-term taste-recognition memory requires temporal protein synthesis at specific times in the IC to be consolidated.

As shown by the reduced consumption during the third intake (Fig. 2C), protein synthesis inhibition after the second taste presentation affected previously consolidated memory. This disruption seems to be partial, because a significant increment is observed during the third intake respective to its first one. Furthermore, we found AN disruption by anisomycin after the second intake even when the third taste exposure was delayed for a week (Fig. 2D). An ANOVA with repeated measures revealed a group effect ($F_{(3,35)} = 4.12$, $p < 0.05$) and a groups \times trials interaction ($F_{(12,140)} = 5.95$, $p < 0.01$). The post-hoc test revealed that the anisomycin groups were different from their respective vehicle groups (p 's < 0.01), as well as from their respective second consumptions (p 's < 0.01). Moreover, recent taste experience is necessary to observe memory disruption by anisomycin injections, as anisomycin injected in the absence of a taste presentation did not significantly affect AN (Fig. 2B, inset). These results show that after retrieval the inhibition of protein synthesis causes partial impairment of the previously consolidated taste memory trace, which in turn is dependent on taste experience but not on the time between experiences. Because AN is a graded learning task it follows that, for each taste presentation, a protein-synthesis-dependent process should be initiated to complete the following AN step.

Because AN can be observed as learning steps, it can be assessed to what extent anisomycin treatment disrupted previously consolidated memory after it is retrieved. In this regard, anisomycin applied into the IC immediately after the third taste intake disrupted the last attained AN step while sparing the previous one (Fig. 2E). A repeated measures ANOVA revealed differences only across presentations ($F_{(4,80)} = 64.49$, $p < 0.01$); however, a paired t -test revealed different consumption for the anisomycin group on the fourth taste experience compared with the third consumption ($t_{(11)} = 4.52$, $p < 0.01$) but was similar to consumption during its second intake. This finding indicates that while updated experience capable of affecting behavior is acquired, part of the older consolidated memory in IC appears not to be dependent on protein synthesis. In addition, when IC protein synthesis was inhibited immediately after the sixth taste intake when AN has clearly reached its plateau, memory was not affected (Fig. 2F). This result suggests that memory is no longer vulnerable to protein synthesis inhibition after asymptotic task performance is reached, presumably because there is no more relevant information to be learned and the older memory has already been consolidated.

An alternative explanation is that the memory returned to a previous step for which the consumption is similar to consumption on the plateau. In this scenario, disruption would not be detected. To discard this possibility, anisomycin infusions into

the IC were delivered consecutively. Consistent with the preceding data, we found that after the fourth taste intake, protein synthesis inhibition disrupts to some extent previously consolidated memory, leaving part of the previously consolidated memory unimpaired (Fig. 3A). Repeated measures ANOVA showed a group \times presentations interaction ($F_{(7,70)} = 2.82$, $p < 0.05$). A further disruption of memory did not occur after two additional anisomycin injections, thereby confirming that part of the previously consolidated memory is independent of protein synthesis in the IC. Finally, three consecutive anisomycin injections into the IC from the 6th to the 8th (Fig. 3B) or from the 11th to the 13th (not shown) taste presentations did not produce aversion and did not disrupt AN behavior.

To further analyze the hypothesis that protein synthesis inhibition impairs previously consolidated memory to a restricted degree only if updating information capable of modifying behavior is integrated to the memory trace, we used an aversive learning task, the conditioned taste aversion (CTA). In this paradigm, a taste (CS) is associated with malaise (US) induced by an intraperitoneal injection of LiCl. We used the associative taste aversion protocol injecting LiCl (0.2 M) after saccharin intake for three consecutive days. As seen in Figure 3C, a clear taste aversion

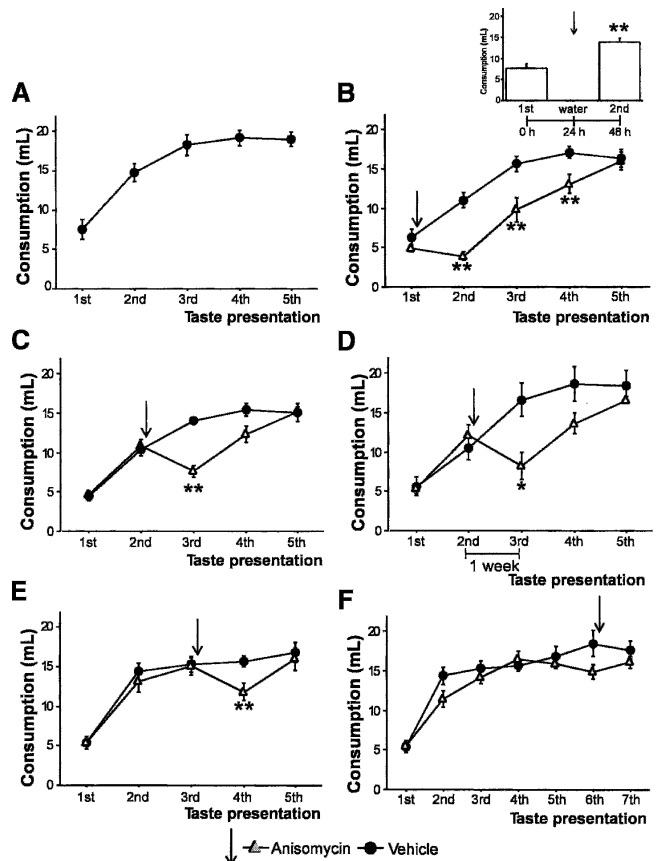


Figure 2. AN typical behavior and protein synthesis inhibition effect on this task. (A) Mean \pm S.E.M. intake (in mL) of 0.3% saccharin on unoperated rats. (B) Anisomycin infusion immediately after the 1st intake, but not 24 h later (inset), prevented taste-recognition memory consolidation. (C,D) Anisomycin infusion after the 2nd taste intake partially disrupted previously consolidated AN, even if the 3rd presentation is delayed for a week. (E) Anisomycin infusion after the 3rd intake disrupted the last attained AN consolidation. (F) Anisomycin infusion after the 6th taste intake spared completed AN behavior. (Solid circles) Vehicle; (open triangles) anisomycin. Arrows indicate drug infusion. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ between anisomycin-infused and corresponding vehicle groups.

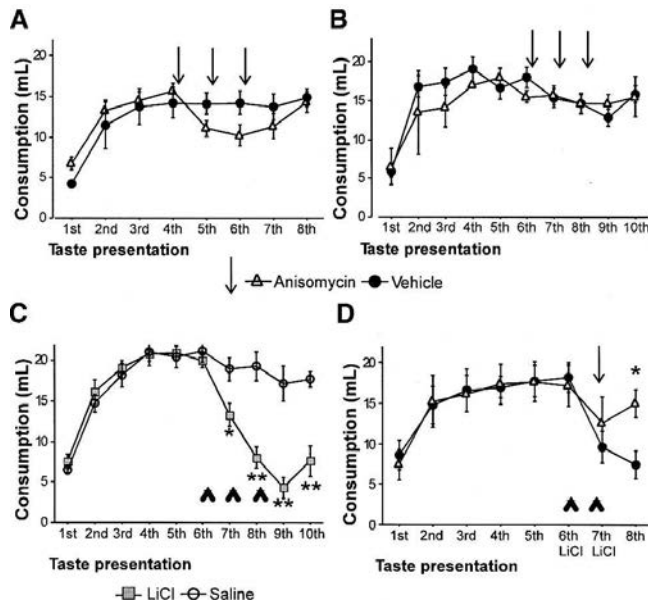


Figure 3. Protein synthesis inhibition in the IC does not impair older consolidated taste memory but disrupts updated aversive experience. (A) Anisomycin injected consecutively after the 4th to the 6th taste presentations disrupted recently consolidated taste memory. (B) Anisomycin injected consecutively after the 6th to the 8th taste presentations spared taste memory. (Solid circles) Vehicle; (open triangles) anisomycin. Arrows indicate drug infusion. (C) A classical malaise agent (LiCl) injected intraperitoneally (i.p.) after the 6th to the 8th saccharin intakes induced an increasing aversion not seen when equivalent volume of saline is injected. (D) Anisomycin injected before taste-malaise association impaired updated aversive experience. (Open circles) Saline; (shaded squares) LiCl. Arrowheads indicate i.p. injections of LiCl or saline solution. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ between treatments.

to 0.3% saccharin was observed despite the AN having reached its plateau (compare 7th and 9th consumptions for Figure 3, B and C). Repeated measures ANOVA revealed a group \times trials interaction ($F_{(9,126)} = 13.12, p < 0.01$). This shows that taste aversion can be learned for a taste already tagged as a safe stimulus (Bures et al. 1998). The outstanding issue is whether this updating aversive memory requires protein synthesis to be retained in long-term storage. To test this issue, anisomycin was injected into the IC on the 7th taste presentation 15 min before the second CS-US association. As shown in Figure 3D, the anisomycin injection disrupted updating aversive information (CS-US association) as indicated by the significant increase in consumption on the 8th taste presentation. In contrast, the intake in the vehicle-injected group was reduced (Fig. 3D). A repeated measures ANOVA revealed a group \times trials interaction ($F_{(7,56)} = 2.89, p < 0.05$). A t -test revealed different consumption for the anisomycin group on the 8th taste experience compared with the vehicle group ($t_{(8)} = 3.14, p < 0.05$). This result demonstrates that protein synthesis is required to update previously consolidated memory trace regardless of the valence of the tastant.

Discussion

In most associative learning tasks, the presentation of the CS during retrieval initiates memory extinction. Extinction has been considered as a form of learning in which animals learn to associate a CS that is no longer followed by a US (Rescorla 1996; Bouton 2004). For taste aversion and inhibitory avoidance tasks, protein inhibition has been reported to disrupt extinction if CS presentation clearly initiates extinction (Berman and Dudai 2001; Vianna et al. 2001). These studies demonstrate that to re-

main in long-term storage, updating extinction memory also requires protein synthesis. However, if CS is presented under conditions in which extinction is not initiated, protein inhibition has been shown to disrupt CS-US association memory (Eisenberg et al. 2003; Pedreira and Maldonado 2003; Sangha et al. 2003). Recently under conditions in which competition between memories does not take place, Duvarci and Nader (2004) and Bozon et al. (2003) found impairment over a previously consolidated memory, by using a retrieval session identical to the training session. Similarly, AN retrieval is achieved by the presentation of the CS of the same valence value, allowing a clearer analysis on consolidation because there is not an extinction process that may establish protein synthesis competition between memories.

This study demonstrates that protein synthesis in the IC is necessary for consolidation and updating consolidation on a taste-recognition memory task. It is important to note that a partial disruption of previously consolidated memory is observed until a response plateau is reached. This impairment is less and less noticeable as maximum performance is attained. Increasing the dosage is unlikely to produce further disruption because the dose of anisomycin we employed inhibits more than 90% of protein synthesis on the IC (Rosenblum et al. 1993). In addition, there is evidence that changes in the retrieval conditions may result in a re-susceptibility of well-consolidated memories to protein synthesis inhibition. In this regard, Suzuki et al. (2004) reported that weak memories are more easily reconsolidated than strong memories. Strong memories require longer reminders to undergo reconsolidation. So, whether different retrieval conditions than those used here (e.g., a longer test session) might reveal an impairment of a well-consolidated taste memory remains to be ascertained. Nevertheless, our results suggest that protein synthesis is required for integrating updating information to an already consolidated memory. Therefore, our main conclusion is that part of the previously consolidated memory requires protein synthesis only if updated experience capable of modifying behavior is acquired.

Several reports have suggested that memory consolidation requires several molecular mechanisms shared by post-retrieval consolidation (Przybylski and Sara 1997; Przybylski et al. 1999; Kida et al. 2002; Pedreira et al. 2002; Bozon et al. 2003), raising the possibility that post-retrieval consolidation is a recapitulation of the original cellular mechanisms for memory consolidation (Sara 2000). However, this interpretation is not supported by other studies (Hall et al. 2001; Tronel and Sara 2002; Kelly et al. 2003). In this regard, in the hippocampus the transcription factor *C/EBP β* was shown to be required for consolidation but not for post-retrieval consolidation for an inhibitory avoidance task (Taubenfeld et al. 2001). More recently, cellular dissociation between consolidation and post-retrieval consolidation has been described for hippocampus-dependent contextual fear conditioning, consolidation being dependent on Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and post-retrieval consolidation on the transcription factor *zif268* (Lee et al. 2004). Furthermore, it has recently been reported that muscarinic receptors activity in the IC is required for AN consolidation but not for AN post-retrieval consolidation (Gutierrez et al. 2003b). These results and our results suggest dissociation between these two processes. That is, post-retrieval consolidation seems to be sensitive to anisomycin infusions but not to a muscarinic antagonist, and consolidation seems to be sensitive to both muscarinic antagonist and anisomycin infusions under similar circumstances (same region and task). The results of our study suggest that cellular events underlying memory are not recapitulated every time memory is retrieved. Instead, it appears that when experience capable of affecting behavior is acquired, a protein-synthesis-

dependent process is initiated to integrate the updated experience with the previously consolidated memory. Accordingly, when no more relevant information is obtained and the performance remains stable, the protein synthesis is no longer required.

In summary, our data suggest that a taste memory trace is not the same each time it is retrieved. Instead, retrieved memory seems to be a state in which updated information is incorporated into an already acquired background either to strengthen (next AN step) or change (e.g., aversive information) a memory trace. We provided evidence that post-retrieval consolidation is not a rewriting for memory as a whole but a state in which the acquisition of updated information into a dynamic memory framework is still possible.

Materials and Methods

Subjects

Male Wistar rats from Instituto de Fisiología Celular breeding colony weighing between 280 and 320 g at the beginning of the experiment were housed individually in plastic cages and kept on a 12 h light/12 h dark cycle. All manipulations were performed during the light cycle. Food was freely available throughout experiments. Experiments were performed in accordance with the Rules in Health Matters (Ministry of Health, Mexico) and with approval of the local Animal Care Committee.

Surgery and microinjection

Animals under sodium pentobarbital (65 mg/kg) anesthesia were bilaterally implanted with stainless-steel guide cannulae in the insular cortex. Coordinates from Bregma were anterior 1.2 mm, lateral ± 5.5 mm, and ventral -4 mm (Paxinos and Watson 1998). Five days after surgery, the behavioral procedures were performed. For bilateral microinjections, an injector was inserted into each guide cannula extending 2 mm below cannula tip. Drugs (1 μ L per hemisphere) were infused over a minute and the injector was left in place for an additional minute to allow diffusion. Anisomycin (Sigma) was dissolved in equimolar HCl and adjusted to 100 mg/mL, pH 7.5 in vehicle solution (ACSF: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 26 mM NaHCO_3 , 10 mM glucose, 2.5 mM CaCl_2). Rats were handled on several days before injection to prevent stress.

Behavioral procedures

Rats were deprived of water for 24 h. Then, they were allowed to drink water once a day. After three consecutive days of water intake, on day 4, rats received saccharin (0.3% w/v) solution for the first time as the neophobia trial. Unless otherwise indicated, on following days the saccharin solution was presented daily to assess AN behavior. To avoid dehydration, water access was given after each saccharin intake. All consumption periods were 15 min long and the volumes ingested were recorded.

For the experiment presented in Figure 3C, the 0.3% saccharin solution on the 6th to the 8th taste intakes was followed by intraperitoneal injection of either LiCl (0.2 M, 10 mL/Kg) or an equivalent amount of saline, 30 min after intake onset.

For the experiment presented in Figure 3D, the 0.3% saccharin solution was followed by intraperitoneal injection of LiCl (0.2 M, 10 mL/Kg) on the 6th and the 7th taste intakes. Anisomycin or vehicle solution was infused 15 min before the 7th taste presentation.

Histology

At the end of the experiments, rats were perfused and their brains removed. Brain sections (40 μ m thick) were stained with cresyl violet and examined by light microscopy for injector tip placement.

Statistical analysis

Repeated measures analysis of variance (ANOVA) was used to compare mean \pm S.E.M. intake of saccharin among groups across trials. The Fisher pairwise test was used for post-hoc analysis, with $p < 0.05$ considered significant. A *t*-test was used to compare intake between groups on a particular trial.

Acknowledgments

We thank Dr. Sid Simon and Jennifer Stapleton for helpful comments. We also thank Federico Jandete, Oreste Carbajal, Francisco Pérez Eugenio, and Yolanda Díaz de Castro for technical assistance. This study was supported by CONACYT-México 42657 and DGAPA.-UNAM IN-202504.

References

- Berman, D.E. 2003. Modulation of taste-induced Elk-1 activation by identified neurotransmitter systems in the insular cortex of the behaving rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **79**: 122–126.
- Berman, D.E. and Dudai, Y. 2001. Memory extinction, learning anew, and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* **291**: 2417–2419.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R., and Dudai, Y. 1998. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J. Neurosci.* **18**: 10037–10044.
- Bermudez-Rattoni, F. 2004. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**: 209–217.
- Bouton, M.E., 2004. Context and behavioral processes in extinction. *Learn. & Mem.* **11**: 485–494.
- Bozon, B., Davis, S., and Laroche, S. 2003. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* **40**: 695–701.
- Bures, J., Bermudez-Rattoni, F., and Yamamoto, T. 1998. *Conditioned taste aversion: Memory of a special kind*. Oxford Science Publications, New York.
- Buresova, O. and Bures, J. 1980. Post-ingestion interference with brain function prevents attenuation of neophobia in rats. *Behav. Brain Res.* **1**: 299–312.
- Debiec, J., LeDoux, J.E., and Nader, K. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* **36**: 527–538.
- de Vos-Korthals, W.H. and van Hof, M.W. 1984. The effect of hypobaric hypoxia on taste neophobia in rats. *Behav. Brain Res.* **14**: 157–159.
- Dogterom, G.J. and van Hof, M.W. 1988. Attenuation of neophobia and conditioned taste aversion in the rabbit. *Behav. Brain Res.* **28**: 253–257.
- Domjan, M. 1976. Determinants of the enhancement of flavored-water intake by prior exposure. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process* **2**: 17–27.
- . 1977. Attenuation and enhancement of neophobia for edible substances. In *Learning mechanisms in food selection* (ed. L.M. Barker, M.R. Best, and M. Domjan), pp. 151–180. Baylor University Press, Waco, TX.
- Duvarci, S. and Nader, K. 2004. Characterization of fear memory reconsolidation. *J. Neurosci.* **24**: 9269–9275.
- Eisenberg, M., Kobilo, T., Berman, D.E., and Dudai, Y. 2003. Stability of retrieved memory: Inverse correlation with trace dominance. *Science* **301**: 1102–1104.
- Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C.J., De La Cruz, V., Nunez-Jaramillo, L., and Bermudez-Rattoni, F. 2003a. Cholinergic dependence of taste memory formation: Evidence of two distinct processes. *Neurobiol. Learn. Mem.* **80**: 323–331.
- Gutierrez, R., Tellez, L.A., and Bermudez-Rattoni, F. 2003b. Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar. *Eur. J. Neurosci.* **17**: 1556–1562.
- Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. 2001. Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **13**: 1453–1458.
- Kelly, A., Laroche, S., and Davis, S. 2003. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J. Neurosci.* **23**: 5354–5360.
- Kida, S., Josselyn, S.A., Peña Ortiz, S., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S., and Silva, A.J. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat. Neurosci.* **5**: 348–355.
- Lee, J.L.C., Everitt, B.J., and Thomas, K.L. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* **304**: 839–843.
- McGaugh, J.L. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* **153**: 1351–1358.

- . 2000. Memory—A century of consolidation. *Science* **287**: 248–251.
- Misanin, J.R., Miller, R.R., and Lewis, D.J. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**: 554–555.
- Nader, K., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**: 722–726.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, CA.
- Pedreira, M.E. and Maldonado, H. 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* **38**: 863–869.
- Pedreira, M.E., Perez, C., and Maldonado, H. 2002. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: Protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J. Neurosci.* **22**: 8305–8311.
- Przybylski, J. and Sara, S.J. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* **84**: 241–246.
- Przybylski, J., Roulet, P., and Sara, S.J. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of β adrenergic receptors. *J. Neurosci.* **19**: 6623–6628.
- Rescorla, R.A. 1996. Preservation of pavlovian associations through extinction. *Q. J. Exp. Psychol. B* **49**: 245–258.
- Rosenblum, K., Meiri, N., and Dudai, Y. 1993. Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav. Neural Biol.* **59**: 49–56.
- Sangha, S., Scheibstock, A., Morrow, R., and Lukowiak, K. 2003. Extinction requires new RNA and protein synthesis and the soma of the cell right pedal dorsal 1 in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurosci.* **23**: 9842–9851.
- Sara, S.J. 2000. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learn. & Mem.* **7**: 73–84.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., and Kida, S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* **24**: 4787–4795.
- Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B., and Alberini, C.M. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . *Nat. Neurosci.* **4**: 813–818.
- Tronel, S. and Sara, S.J. 2002. Mapping of olfactory memory circuits: Region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn. & Mem.* **9**: 105–111.
- Vianna, M.R.M., Szapiro, G., McGaugh, J.L., Medina, J.H. and Izquierdo, I. 2001. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 12251–12254.

Received March 11, 2005; accepted in revised form June 16, 2005.



11 Memory Reconsolidation or Updating Consolidation?

Carlos J. Rodriguez-Ortiz and Federico Bermudez-Rattoni

CONTENTS

11.1 Introduction	209
11.2 Consolidation Hypothesis	210
11.3 Reconsolidation Era	211
11.4 On Restraints of Reconsolidation Hypothesis.....	213
11.5 Consolidation and Reconsolidation: The Same Process?	215
11.6 Reconsolidation Hypothesis Reconsidered: Updating Consolidation Proposal	216
Acknowledgments.....	221
References.....	221

11.1 INTRODUCTION

For a long time, consolidation was seen as a process achieved only on newly acquired memories aimed to store them for the long term. However, pioneer and recent studies have demonstrated that after retrieval, long-term memories may once more undergo a consolidation-like process referred to as reconsolidation. Mainly, reconsolidation is sustained by the now widely reported observation that after a memory trace is activated by means of retrieval and is susceptible to disruption by the same treatments that disrupt memory during consolidation. However, the functional purpose of this process is still a matter of debate.

Recent evidence indicates that reconsolidation is indeed a process by which updated information is integrated through the synthesis of proteins to a memory trace. Hence, the so-called reconsolidation seems more like an updating consolidation intended to modify retrieved memory by a process that integrates updated experience into long-term memory. Through this process, previously consolidated memory is partially destabilized. By the infusion of disrupting agents, it appears as if the process is intended to consolidate memory again. In this chapter, we discuss



this issue and propose that updating consolidation is a more descriptive term for this process.

11.2 CONSOLIDATION HYPOTHESIS

The classification of memories according to their duration was initiated by Hermann Ebbinghaus in his work titled “Über das Gedächtnis” (About Memory) and formalized later by William James. From these works it appears that memory has, on the basis of its time course, at least two forms, namely short- and long-term memories. Although no fixed time span segregates these two memory forms, it is clear that information stored in long-term memory (LTM) undergoes a consolidation process that strengthens it over time into a stable memory trace.

This process does not take place for short-term memory (STM), which decays much sooner. The term *consolidation* is acknowledged to Müller and Pilzecker on their study reported in 1900. In one set of experiments, they trained subjects to memorize a list of paired syllables. On the test day, cue syllables (each one was a single syllable of a pair) were presented and the number of complementary recalled syllables was used as a measure of memory retention. A reduction in the number of retrieved syllables from the first list was observed if a second (distracting) list of syllables was presented shortly after training. Furthermore, the longer the interval between the two lists, the less the performance was affected. The researchers concluded that the second list interfered in a time-dependent manner on a physiological process that accounts for the strengthening of memories. They named this process “consolidierung.”¹

These observations were mostly ignored until Duncan reported almost 50 years later that he proved that an electroconvulsive shock (ECS) applied after training disrupted memory. Moreover, he showed that memory disruption correlated with the interval between training and ECS application. Since ECS was longer spaced in time from training, memory impairment was reduced. Since then, several other researchers have shown that interfering treatments — from ECS to intracerebral microinjections of protein synthesis inhibitors — applied after acquisition prevent LTM storage. Consistently, LTM is not affected if the intrusive treatment is applied outside the vulnerability window. This, along with the consolidation hypothesis, led to the idea that memory undergoes this time-dependent stabilization process only once. Reliability among a huge amount of related studies sustained the prominent place that this idea occupies in the current model of consolidation.^{2,3}

An important transition in memory research took place after Hebb’s dual-trace proposal suggesting that memory is at first in a labile state maintained by a reverberating neural ensemble. LTM arises from cellular changes in this ensemble allowing memory stabilization.⁴ Although it is still matter of intense debate whether STM and LTM are serial or parallel processes, dual-trace theory stressed the weight that cellular entities have in memory processing, turning research to the cellular events underlying memory. At the cellular level, STM undergoes activation of *transduction*¹ cascades (mainly kinase pathways) after neuronal stimulation. It is proposed that

¹ Process by which a cell converts an extracellular signal into a response.⁵

STM remains as long as these cascades are active but for LTM, transduction signals are carried to the nucleus where *transcription*^{1*} is achieved. Afterward, RNA *translation*² will ultimately lead to protein synthesis. These proteins account for a P.s MAion memorying

cellular plastic changes that are considered the cellular correlations of stable LTM traces, i.e., they are considered the cellular counterparts of consolidation. Hence, memory consolidation requires protein synthesis. It has been extensively reported that protein synthesis inhibition disrupts LTM without affecting STM.^{3,7-9}

11.3 RECONSOLIDATION ERA

As noted earlier, consolidation was seen as a process achieved only on newly acquired memories with the intent of long-term storage. However, pioneer studies indicated that consolidated memories may undergo a consolidation-like process more than once under certain conditions. In 1968, Misanin et al.¹⁰ habituated rats to lick from a drinking bottle in a conditioning chamber, after which they were trained in a fear conditioning task in which a tone (conditioned stimulus, CS) was paired to a footshock (unconditioned stimulus, US). As a result, a conditioned response was obtained and used as a measure of memory, in this case, a reduced licking rate from the water bottle after the tone onset. They reported that an ECS applied immediately after conditioning disrupted memory consolidation (Figure 11.1b, Group 2). The interesting point arose from Group 3. Those animals were trained but without delivery of an ECS. A day later, the consolidated fear memory was reactivated by presenting the tone again. Immediately after this memory reactivation, an ECS was applied with the surprising result that memory was impaired when tested 24 hours later (Figure 11.1b, Group 3). Notably, ECS was unable to disrupt memory if the tone cue was not presented (Figure 11.1b, Group 4) and the phenomenon was referred as cue-dependent amnesia.¹⁰

Even though these results were at first not replicated,¹¹ they encouraged further (mainly unnoticed) work on the possibility that consolidated memories enter into an active stage upon retrieval. For example, Gordon showed that as occurs with newly acquired memories, retrieved memories are susceptible to disruption in a time-dependent manner.¹² Cue-dependent amnesia was further studied in the active-inactive memory model proposed by Lewis,¹³ who claimed that memories become active under two conditions: when newly acquired and when reactivated by means of retrieval. Any other memory is in an inactive stable state. Recently, cue-dependent amnesia was taken up again and is now referred as reconsolidation.

Reconsolidation proposes that after a memory trace is activated by means of retrieval, it is susceptible to disruption by the same treatments that disrupt memory during consolidation.^{14,15} In 1992, Bucherelli and Tassoni¹⁶ reported that inactivation of the parabrachial nuclei by infusions of tetrodotoxin disrupted previously consolidated memories when reactivated. Similarly, Susan Sara's group reported that infusions of either NMDA or -adrenergic antagonists (which disrupted LTM when

^{1*} *Synthesis of RNA on DNA template.*⁶

² *Synthesis of protein on mRNA template.*⁶

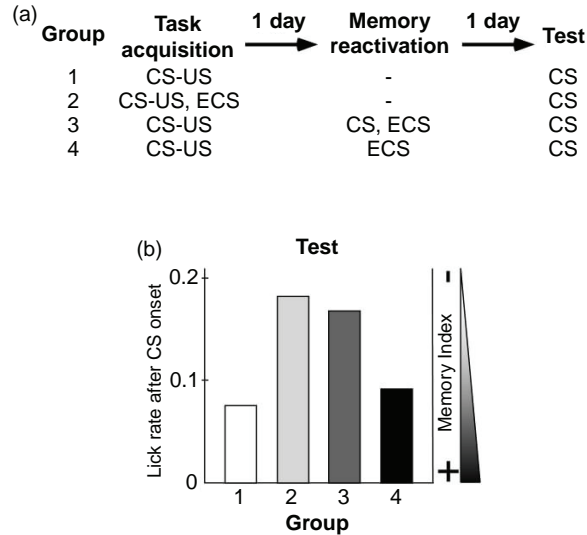


FIGURE 11.1 Data from first report on retrograde amnesia induced after memory reactivation. (a) Schematic representation of protocol used by Misanin et al. (b) Group 1 shows fear conditioning behavior displayed under this protocol, measured as reduced licking from a water tube after CS onset. ECS disrupted fear LTM either when applied after conditioning (Group 2) or after memory reactivation (Group 3). Group 4 shows that the ECS effect on Group 3 is dependent on memory reactivation. For clarity, an arbitrary memory index is shown on the right side of the graph. CS = conditioned stimulus (80-dB white noise for 10 sec on treatment day 1, 2 sec on day 2, and 10 sec or ten licks on test day). US = unconditioned stimulus (1.3-mA shock to floor grids for 3 sec simultaneously with CS offset). ECS = electroconvulsive shock (0.5-sec, 40-mA shock applied through earclips attached to subjects). Adapted from Misanin, J.R. et al., *Science*, 160, 554, 1968. With permission.

applied after training) disrupted a clearly established memory trace upon retrieval.¹⁷⁻¹⁹ Since then, memory reconsolidation has actively been studied.

The most acknowledged study is the one carried out by Nader and coworkers in 2000.²⁰ This work brought general attention to the reconsolidation phenomenon because of the clean data reported and because of the use of a translational inhibitor that interfered with protein synthesis, considered to be the main cellular substrate for memory consolidation. The experiments were performed in the widely studied fear conditioning task and showed that the same treatment applied under circumstances that disrupt consolidation also impairs memory after retrieval. Similar to the report by Misanin and coworkers, Nader et al. conditioned rats in a tone-footshock association but memory was assessed by the percentage of the time that rats were immobile (except for movements required for breathing) to the total time the tone was presented (freezing). The day after conditioning, the protein synthesis inhibitor anisomycin was injected in the amygdala after the tone presentation.

When the subjects were tested 24 hours later, they performed poorly compared to the rats that were not anisomycin-injected (Figure 11.2b). The same treatment

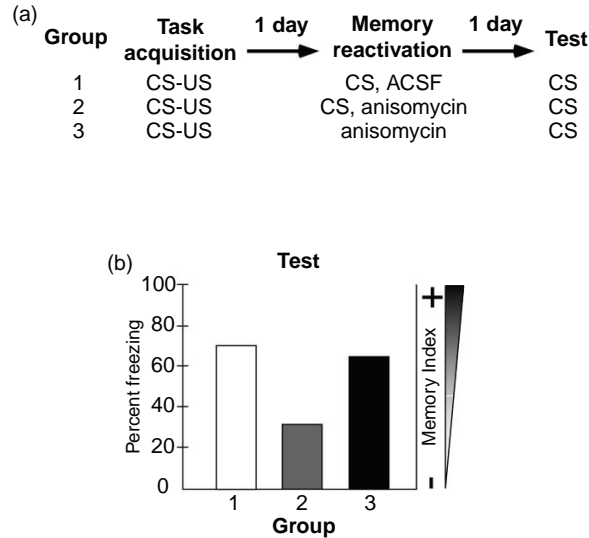


FIGURE 11.2 Intraamygdalar infusion of a protein-synthesis blocker disrupts consolidated fear memory. (a) Schematic representation of protocol used by Nader et al. (b) Group 1 shows fear conditioning behavior displayed under this protocol, measured as high percentage of time the CS is presented in immobility. Anisomycin disrupted the previously consolidated fear LTM when applied after memory reactivation (Group 2). Group 3 shows that anisomycin effect on group 2 is dependent on memory reactivation. For clarity, an arbitrary memory index is shown on the right side of the graph. CS = conditioned stimulus (75-dB, 5-KHz tone for 30 sec). US = unconditioned stimulus (2-mA footshock for 1 sec simultaneously with CS offset). ACSF = artificial cerebrospinal fluid. Anisomycin = 62.5 g/0.5 L per hemisphere). Adapted from Nader K. et al., *Nature*, 406, 722, 2000. With permission.

Au: Unit
okay?

was unable to disrupt memory if a retrieval session was not performed (Figure 11.2b, Group 3). The researchers also showed that the effects of anisomycin were time-dependent. When injected 6 hours after memory reactivation, it is unable to disrupt memory. In the years following the Nader study, a wide variety of reports have shown that reconsolidation is indeed a general process achieved in different species and different kinds of memories.^{21–30}

11.4 ON RESTRAINTS OF RECONSOLIDATION HYPOTHESIS

Despite the huge body of experiments supporting reconsolidation, some did not uncover consolidated memory susceptibility to disruption after retrieval.^{31–34} However, some recent reports have helped explain to an extent why a reconsolidation process is not revealed under certain protocols.^{26,35,36} To address this issue, we must first look to what is called extinction and again take up the conditioning protocol on which a great number of memory tasks rely. On conditioning, a CS, like a tone,



is associated to an US, like a footshock. As a result, the CS elicits a response that is used as a measure of memory, like freezing.

However, CS presentation in the absence of US eventually leads to a response decrement; in our example, animals stopped freezing. This is extinction. On extinction, the CS is now associated to no-US. Like any other learning, extinction undergoes consolidation. To assess reconsolidation, the CS is commonly presented as a retrieval cue that may lead to extinction. During testing, treatments applied on retrieval may reflect effects over the CS-US association in which case disruption of the conditioned response is observed (reconsolidation is uncovered).

On the other hand, treatments may impair consolidation of extinction, in which case the CS-US association seems unaltered. On this latter scenario, results may be interpreted as lack of a reconsolidation process. Hence, studies like Vianna et al.³² and Berman and Dudai³¹ reported that protein synthesis inhibition disrupted extinction, leaving CS-US association unimpaired or even strengthened, and pointing at the impression that reconsolidation does not occur under these protocols.

Pedreira and Maldonado³⁵ offered evidence to move forward using a contextual memory task in crabs. When crabs are placed in a particular context and an object is passed overhead, they escape from the moving object, but when this stimulus is repeated several times, the crabs freeze upon presentation of the passing object. However, when the context is changed, freezing of the crabs does not take place. Thus, the context is associated to the passing object and freezing is used as a measure of memory. To induce extinction, the animals were exposed to the context in the absence of the passing object. Pedreira and Maldonado placed conditioned crabs in the training context for either 5 or 60 min as a retrieval session. During the session, they systemically applied the protein synthesis inhibitor cycloheximide and tested 24 hours later. Crabs exposed for 5 min did not undergo a clear extinction and when tested, effects over reconsolidation were found. Conversely, crabs exposed for 60 min extinguished the conditioned response and when tested, extinction was impaired.

These findings have been replicated by many others.^{26,36} Eisenberg et al.²⁶ trained rats in a taste aversion task. Task acquisition was achieved by pairing a taste with an intraperitoneal injection of a visceral malaise-inducing agent (LiCl). Taste-malaise association produced a long-term aversive memory observed by a reduced intake of that taste in a second presentation compared to its consumption on acquisition. However, on the third presentation, intake was increased, showing that the aversive memory was extinguished. Protein synthesis inhibition disrupted extinction when applied on the second taste presentation leaving CS-US pairing unaltered, i.e., a failing to detect a reconsolidation process.

However, when rats were subjected to the taste-malaise association for two consecutive sessions, extinction was not observed on the subsequent presentations. Under these conditions, protein synthesis inhibition on the presentation following the association sessions showed aversion impairment when the animals were tested, i.e., reconsolidation was revealed. In the same study, medaka fishes were trained in a fear conditioning task. Consistent with the results obtained from rats, protein synthesis inhibition on the session that led to extinction affected consolidation of extinction and, in the absence of extinction, protein synthesis inhibition impaired CS-US reconsolidation. Thus, when consolidation of extinction

memory was initiated on the retrieval session, reconsolidation of the CS-US association was not observed.

Other authors have found that pharmacological treatments disrupted LTM of recently consolidated but not older consolidated memories.^{37,38} That is, when the retrieval session takes place on the days following acquisition, memory is susceptible to consolidation blockers. However, as the retrieval session is spaced in time from training, memory becomes less sensitive to these blockers. These results point to the idea that reconsolidation is a process achieved only by recently consolidated memories upon retrieval. However, Suzuki and co-workers³⁶ reported that stronger and older memories are susceptible to disruption upon retrieval too. They showed that stronger and older memories need of a longer retrieval trial were more disrupted by the blockade of protein synthesis than weaker and younger memories. Consistent with the reports of Pedreira and Maldonado³⁵ and Eisenberg et al.,²⁶ these effects were found as long as the retrieval trial did not lead to extinction. Therefore, it seems that the strength of the reminder is related to memory susceptibility to disruption after retrieval.

11.5 CONSOLIDATION AND RECONSOLIDATION: THE SAME PROCESS?

Probably the most important question regarding the reconsolidation process is: why and under what circumstances is reconsolidation attained? At first glance, it seems counterintuitive to carry out an already achieved process again, i.e., to consolidate once more an already consolidated memory, as is implied by the reconsolidation term. It has been reported that some of the molecular mechanisms involved in consolidation are also required for reconsolidation of the same memory trace and in the same brain region.^{20,23,24,26,39-43}

For example, particular transcription factors have been proven necessary for both consolidation and reconsolidation processes in different memory tasks. Kida and colleagues⁴⁰ showed CREB involvement in contextual fear conditioning¹ memory in mice. Also in mice, Bozon and co-workers⁴¹ reported a zif268 requirement in object recognition memory^{2*} and finally, Merlo et al.⁴² showed NF-B participation in contextual memory using the crab model described above. In rats, Duvarci, Nader, and LeDoux⁴³ showed that the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway must be activated in the amygdala for both consolidation and reconsolidation of fear conditioning. Furthermore Sangha et al.²⁴ reported that for the *Lymnaea stagnalis*

¹ In this protocol, a context (CS) like a particular chamber is associated with a footshock (US). As with fear conditioning, the response used as a measure of memory is freezing (in this case, a reaction to the chamber, not to a tone).

^{2*} This kind of memory reflects the judgment of previous experience with particular stimuli. The tasks commonly rely on the natural tendency of rodents to explore new stimuli. In the first phase, animals are habituated to a novel stimulus like a light bulb. After a delay, the second phase involves presentation of a copy of the bulb along with some other stimulus like a glass jar. During this phase, the animals explore the jar over the bulb, indicating that the jar is a new stimulus and the bulb a familiar one, that is, the bulb is recognized as a familiar stimulus.

snail, consolidation and reconsolidation occurred in the same cell. These data indicate that reconsolidation may be a remaking of the consolidation process.¹⁵

However, several other studies suggest that consolidation and reconsolidation are different processes. Taubenfeld and colleagues⁴⁴ reported that the transcription factor C/EBP is needed for consolidation but not for reconsolidation of a context-dependent task in the dorsal hippocampus. Tronel and Sara⁴⁵ described differential activation of several brain regions after retrieval compared to consolidation of an odor-reward task learning analyzed by *c/Fos* immunohistochemistry. In the same regard, Kelly and co-workers²⁸ demonstrated an increase in phosphorylation of ERK kinases in the dentate gyrus and the entorhinal cortex after training in an object recognition task along with increased phosphorylation in the hippocampal CA1 region and the entorhinal cortex after memory retrieval. On taste memory, it was reported that muscarinic receptor activity in the gustatory cortex is required for safe memory consolidation but not for post-retrieval consolidation.⁴⁶ Similarly, protein synthesis in the central amygdala is required for consolidation but not for reconsolidation of conditioned taste aversion.⁴⁷ Finally, Lee et al.⁴⁸ reported that the growth factor BDNF is required for consolidation but not for reconsolidation, and transcription factor *zif268* is needed for reconsolidation but not consolidation in the same brain region and memory task. All this evidence discards the possibility that reconsolidation is a recapitulation of consolidation but does not solve the problem. The question remains: what is the physiological purpose of reconsolidation?

11.6 RECONSOLIDATION HYPOTHESIS RECONSIDERED: UPDATING CONSOLIDATION PROPOSAL

Early and recent reviews suggest that reconsolidation may be a state for incoming information to modify established memories but experimental support is almost completely absent.^{13,14,49,50} However, our group recently reported that newly acquired and retrieved taste recognition memory is susceptible to disruption by the protein synthesis inhibitor anisomycin when applied in the insular cortex (IC), a proven site for taste memory consolidation. In that work, the attenuation of neophobia (AN) task was used. Animals showed graded increases in intake after repeated presentations of the same tastant until a plateau was reached (Figure 11.3a).^{51,52}

Importantly, anisomycin injections produced a partial disruption of previously consolidated memory and the observed impairment became less noticeable as a response plateau was reached (Figure 11.3b and c). On asymptotic performance, anisomycin affects no-longer-consolidated memory (Figure 11.3d). These results led to the proposal that a protein synthesis-dependent process is achieved as long as updated experience capable of affecting behavior is acquired. This process is aimed to integrate updated relevant information to LTM. Consistently, part of the older consolidated memory is dependent on protein synthesis. Partial susceptibility to disruption of a previously consolidated memory trace may be the physiological substrate that allows incoming material to integrate to memory.

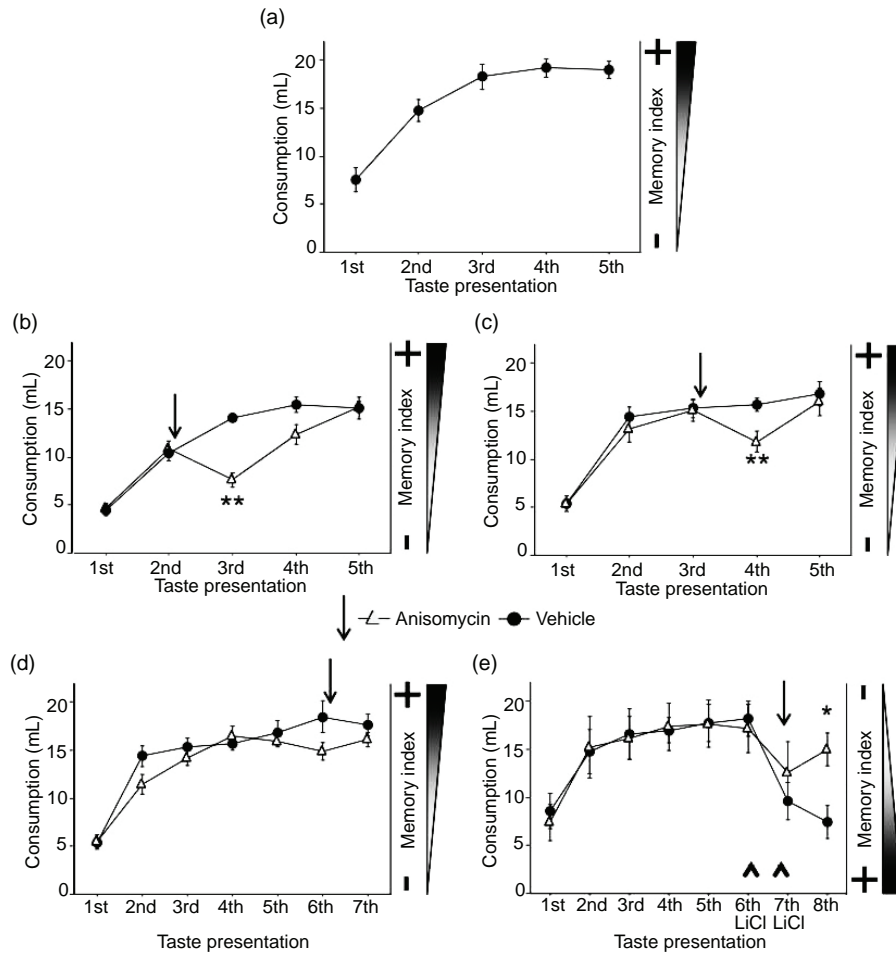


FIGURE 11.3 Attenuation of neophobia (AN) behavior and protein synthesis inhibition effect (a) Mean \pm S.E.M. intake (in mL) of 0.3% saccharin solution on unoperated rats. Taste presentations were daily for 15 min. (b) and (c) Anisomycin infusion in insular cortex (IC) after the second or third taste intake partially disrupted previously consolidated memory. (d) Anisomycin infusion after sixth taste intake spared completed AN behavior. (e) Protein synthesis inhibition in IC disrupted updated aversive experience. A classical malaise agent (LiCl 0.2 M, 10 mL/Kg) injected i.p. 30 min after the sixth and seventh saccharin intake onset induced increasing aversion. Anisomycin injected before taste-malaise association impaired long-term aversive memory (eighth presentation). Solid circles = vehicle (ACSF). Open triangles = anisomycin (100 μ g/ μ L/hemisphere). Arrows = drug infusion. Arrowheads = i.p. injections of LiCl solution. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ between anisomycin-infused and corresponding vehicle groups. For clarity, an arbitrary memory index is shown on the right side of each graph. Adapted from Rodriguez-Ortiz, C.J. et al., *Learn. Mem.*, 12, 533, 2005. With permission.



Furthermore, when there is no more relevant information to be learned, i.e., after asymptotic task performance is reached, memory is no longer vulnerable to protein synthesis inhibition. Moreover, when the AN plateau has been reached and information of a different quality is provided, like aversive information, the protein synthesis-dependent process is achieved once more (Figure 11.3e).⁵³

These results were partially replicated in a widely studied hippocampus-dependent memory task, the Morris water maze (WM). In this task, animals escape from cool water by finding a hidden platform underwater. To do so, animals learn spatial cues around the room to locate the platform.⁵⁴ Rats were trained for either 3 or 5 consecutive days in the WM task. Seven days later on the memory reactivation session, rats swam for 60 sec without the platform and memory was assessed by counting the number of crossings to the platform location during training.

Clearly, the animals trained for 5 days performed much better than those trained only for 3 days. Thus, 3-day trained rats were designated middle-trained and 5-day trained rats were referred to as well-trained. When tested 7 days after the reactivation session, middle-trained subjects infused with a consolidation blocker in the dorsal hippocampus on reactivation performed poorly compared to the corresponding vehicle group. However, the same treatment did not affect consolidated memory in well-trained animals, presumably because no further updating was attained.⁵⁵ Similarly, Morris et al.⁵⁶ reported that asymptotic WM task performance was not affected by protein synthesis inhibition in the dorsal hippocampus.

Conversely, task performance was disrupted by the same treatment when updating information was continuously acquired. They trained rats for 6 days in the WM task with the platform in a constant position. On day 7, retrieval was accounted by a single trial and anisomycin was immediately injected locally. Under these conditions memory was unimpaired. Interestingly, when the platform location was changed daily during training, anisomycin injection after retrieval on day 7 disrupted previously consolidated memory. The authors concluded that acquisition of new information is required to observe a previously acquired CS-US association is termed second order conditioning. consolidated memory susceptibility to protein synthesis inhibition.

ilarly, Morris et al. Thus, the so-called reconsolidation seems more like an updating consolidation intended to modify retrieved memory by a process that integrates updated experience into long-term memory. Previously consolidated memory is partially destabilized and by the infusion of disrupting agents it appears as if the process is intended to consolidate memory again. Two important features must be stressed about the updating consolidation process: it is time- and protein synthesis-dependent. These features again bring attention to the cellular changes that account for LTM, i.e., the stabilization of neural ensembles.⁴

Updating consolidation may be the process by means of which neural ensembles are modified and stabilized into updated memory traces. This proposal is based on the analysis of behavior, and even though it is clear that behavior is not merely a reflection of memory; we think it is possible to outline some of the changes that the updating consolidation process may produce in the memory traces based on the behavioral observations depicted above (for more on the behavior-memory dichot-

omy see Chapter 1 In a simple scenario, two types of information can modify behavior.

Reinforcement of previous learning — As with a learning curve, previous learning is strengthened on each trial because information of the same quality is acquired. Keeping in mind that a neuronal ensemble underlies a particular memory, reinforcing information may modify the existing consolidated trace by two means: by making the synaptic weights of the already existing ensemble stronger or by addition of cellular entities to the previously consolidated ensemble. In both cases, modifications of the synaptic weights involved in the ensemble are required.

Using artificial neural network simulation, it has been proposed that in order to preserve old memories while learning sequential new patterns, an active maintenance process is required. Otherwise, old memory is lost with incoming information. In this model, new learning is incorporated to old patterns by partially rehearsing the old ones. Importantly, modifications in synaptic weights are needed if the ensemble is to retain previously stored material while learning new information.⁵⁷

Updating consolidation is the proposed mechanism that permits modifications of the ensemble. By protein synthesis inhibition, updating consolidation is unveiled in the limited disruption of previously acquired information that is less noticeable as plateau performance is reached. Consistently, lack of memory disruption by protein synthesis inhibitors correlates with the asymptotical level in task performance. In this regard, positive modulation of a retrieved memory was reported in crabs.⁵⁸ The study showed that through retrieval, a weak memory is strengthened by an endogenous brain mechanism mediated by angiotensin II. Although, positive modulation of retrieved memories has been reported,^{14,59} this study was done to shed light upon the functional value of reconsolidation. In accordance with the updating consolidation proposal, the researchers concluded that reconsolidation is a state for modifying memory strength.

A last piece of evidence comes from memory studies in chicks. Summers et al.⁶⁰ reported that a weak memory is strengthened by means of retrieval. They suggested that memory retrieval initiates a mechanism that allows incorporation of information acquired in the retrieval session to LTM. However, memory retrieval was found to modify memory as long as consolidation was not accomplished. Thus, this mechanism in chicks seems limited to the time before memory is stored.^{60,61} This is not the case in rats, where memory can be modified after consolidation is attained and even more, as noted above, limited disruption of previously consolidated memory is observed.

Shift of previous learning — Divergent information is integrated to previously consolidated memory. For example, taste aversion can be learned from a taste already tagged as a safe stimulus.^{53,62} Under these conditions, taste aversion requires a protein synthesis-dependent process to be stored in the long term. One possibility for this integration to occur is that the ensemble suffers greater modifications than when strengthening information is acquired. On the other hand, a different but overlapping trace would be created for this divergent information, in which case modifications in the synaptic weights involved in the first ensemble would take place as well. Overlapping between the ensembles is supposed because they represent divergent associations between overlapping stimuli. In our taste memory example, this over-

lapping is uncovered on the aversion level that animals show to a taste previously tagged as safe (Figure 11.3e). Less aversion is observed when compared to the aversion shown to the same taste when novel. Reinforcement of aversive learning is required to reach similar aversion levels when the taste was previously learned as safe.

Another example has been reported in the *Manduca sexta* moth. Daly and colleagues⁶³ found progressive neural recruitment and changes on network activity over the course of olfactory conditioning. Their results point to the idea that olfactory memory traces are modified upon experience. Hence, memories are not separate entities; rather they overlap to some extent. Overlapping of the traces is determined by the similarities of the involved information. This idea is in line with previous theories regarding incorporation of recent experiences into long-term knowledge background.⁶⁴⁻⁶⁶

Extinction is another possibility in which a memory trace can be updated by divergent information. Ample evidence indicates that extinction is not forgetting nor erasing of conditioning learning, but a related learning that elicits a behavioral shift upon CS presentation.⁶⁷ This evidence is congruent with the proposed model of updating consolidation. Updating does not imply erasing of previous learning but incorporation of a related learning that takes over behavior.⁵³

Eisenberg and Dudai³⁸ consistently reported that disrupted memory upon retrieval is recovered by presentation of an unpaired reinforcer. Similarly, contextual conditioning memory disrupted after retrieval was shown to recover spontaneously after 21 days.⁶⁸ Power et al.⁶⁹ found contextual-conditioning memory recovery 6 days after acquisition and, moreover; using the same memory task, Prado-Alcalá et al.⁷⁰ reported that repeated retrieval sessions are sufficient to fully recover memory previously affected on retrieval by tetrodotoxin injections.

These results suggest that disruption of the reconsolidation process does not abolish consolidated memory; instead, the observed memory destabilization known as reconsolidation may be related to interference with the proposed updating process aimed at the integration of related learning. The result of this process will be stable overlapping traces. The relationships of these converging (trace reinforcement) or diverging (trace shift) overlapping traces will determine behavior.

Recently, it was reported that reconsolidation and integration of new information to memory are dissociable processes. Animals were conditioned using a light and a context as CSs, and footshocks as USs. On retrieval, a new context and the same light were presented without the US. As a consequence, an association was established between the first conditioning, i.e, the first CS-US association, and the new context. When tested, animals elicited the conditioned response (freezing) when placed in the second context, that is, a new CS.

The association between a CS and a previously acquired CS-US association is called second order conditioning. Inhibition of the transcription factor C/EBP in the hippocampus disrupted LTM of the second conditioning. Conversely, if retrieval is assessed presenting the same stimuli as in acquisition C/EBP is required in the amygdala for memory to remain. Thus, it was concluded that linking new of information occurs without destabilizing the retrieved memory.⁷¹



Contrary to this, we found in two different memory tasks and regions that partial disruption of consolidated memory is observed by consolidation blockers upon memory updating. Moreover, protein synthesis is still required in the same region even though updated information is of different quality. It is important to note that the differences in molecular mechanisms found by Tronel et al.⁷¹ indeed support the view that linking new information is not the same as reinforcement of previous learning (as reconsolidation is not a bona fide copy of consolidation), but do not support that reconsolidation is not intended to update memory.

The important issue is that reinforcement of previous learning is not synonymous with reconsolidation and that linking new information is different from a reconsolidation process. On their retrieval protocol, Tronel et al. used either the same (which they called reconsolidation) or different information (another context they called linking new information) compared to acquisition. Integration of information of one kind does not necessarily imply that integration of another kind requires the same mechanisms. All in all, we consider that evidence is accumulating for the hypothesis that reconsolidation is indeed an updating consolidation. In this time- and-protein synthesis-dependent process, retrieved memory seems to be modified by the integration of updated relevant experience.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Oreste Carbajal for technical assistance. Part of the work described in this chapter was supported by CONACYT-México 42657/A-1 and DGAPA.-UNAM IN-220706-3.

REFERENCES

1. Lechner, H.A., Squire, L.R., and Byrne, J.H., One hundred years of consolidation: remembering Muller and Pilzecker, *Learn. Mem.*, 6, 77, 1999.
2. McGaugh, J.L., Time-dependent processes in memory storage, *Science*, 153, 1351, 1966.
3. McGaugh, J.L., Memory: a century of consolidation, *Science*, 287, 248, 2000.
4. Hebb, D.O., *The Organization of Behavior*, John Wiley & Sons, New York, 1949.
5. Alberts B. et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., Taylor & Francis group, New York, 2002.
6. Lewin, B., *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2004.
7. Davis, H.P. and Squire, L.R., Protein synthesis and memory: a review, *Psychol. Bull.*, 96, 518, 1984.
8. Goelet, P. et al., The long and the short of long-term memory: a molecular framework, *Nature*, 322, 419, 1986.
9. Kandel, E.R., The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses, *Science*, 294, 1030, 2001.
10. Misánin, J.R., Miller, R.R., and Lewis, D.J., Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace, *Science*, 160, 554, 1968.



11. Dawson, R.G. and McGaugh, J.L., Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: further examination, *Science*, 166, 525, 1969.
12. Gordon, W.C., Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon, *Physiol. Behav.*, 18, 95, 1977.
13. Lewis, D.J., Psychobiology of active and inactive memory, *Psychol. Bull.*, 86, 1054, 1979.
14. Sara, S.J., Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering, *Learn. Mem.*, 7, 73, 2000.
15. Nader, K., Memory traces unbound, *Trends Neurosci.*, 26, 65, 2003.
16. Bucherelli, C. and Tassoni, G., Engram activation reinstates the susceptibility of consolidated memory traces to retrograde amnesia by functional blockade of parabrachial nuclei, *Behav. Brain Res.*, 51, 61, 1992.
17. Przybylski, J. and Sara, S.J., Reconsolidation of memory after its reactivation, *Behav. Brain Res.*, 84, 241, 1997.
18. Roullet, P. and Sara, S., Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase, *Neural Plast.*, 6, 63, 1998.
19. Przybylski, J., Roullet, P., and Sara, S.J., Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta-adrenergic receptors, *J. Neurosci.*, 19, 6623, 1999.
20. Nader, K., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E., Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval, *Nature*, 406, 722, 2000.
21. Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J., Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories, *J. Neurosci.*, 21, 2186, 2001.
22. Pedreira, M.E., Perez-Cuesta, L.M., and Maldonado, H., Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors, *J. Neurosci.*, 22, 8305, 2002.
23. Debiec, J., LeDoux, J.E., and Nader, K., Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus, *Neuron*, 36, 527, 2002.
24. Sangha, S., Scheibenstock, A., and Lukowiak, K., Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1, *J. Neurosci.*, 23, 8034, 2003.
25. Child, F.M. et al., Memory reconsolidation in *Hermisenda*, *Biol. Bull.*, 205, 218, 2003.
26. Eisenberg, M. et al., Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance, *Science*, 301, 1102, 2003.
27. Walker, M.P. et al., Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation, *Nature*, 425, 616, 2003.
28. Kelly, A., Laroche, S., and Davis, S., Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory, *J. Neurosci.*, 23, 5354, 2003.
29. Salinska, E., Bourne, R.C., and Rose, S.P., Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task, *Eur. J. Neurosci.*, 19, 3042, 2004.
30. Wang, S.H. et al., Consolidation and reconsolidation of incentive learning in the amygdala, *J. Neurosci.*, 25, 830, 2005.

31. Berman, D.E. and Dudai, Y., Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex, *Science*, 291, 2417, 2001.
32. Vianna, M.R.M. et al., Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12251, 2001.
33. Cammarota, M. et al., Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory, *Learn. Mem.*, 11, 572, 2004.
34. Izquierdo, I. et al., The inhibition of acquired fear, *Neurotox. Res.*, 6, 175, 2004.
35. Pedreira, M.E. and Maldonado, H., Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration, *Neuron*, 38, 863, 2003.
36. Suzuki, A. et al., Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures, *J. Neurosci.*, 24, 4787, 2004.
37. Milekic, M.H. and Alberini, C.M., Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation, *Neuron*, 36, 521, 2002.
38. Eisenberg, M. and Dudai, Y., Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in *Medaka*: old fears don't die, *Eur. J. Neurosci.*, 20, 3397, 2004.
39. Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J., Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala, *Eur. J. Neurosci.*, 13, 1453, 2001.
40. Kida, S. et al., CREB required for the stability of new and reactivated fear memories, *Nat. Neurosci.*, 5, 348, 2002.
41. Bozon, B., Davis, S., and Laroche, S., A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval, *Neuron*, 40, 695, 2003.
42. Merlo, E. et al., Activation of the transcription factor NF-kappa-B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation, *Learn. Mem.*, 12, 23, 2005.
43. Duvarci, S., Nader, K., and LeDoux, J.E., Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning, *Eur. J. Neurosci.*, 21, 283, 2005.
44. Taubenfeld, S.M. et al., The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP-beta, *Nat. Neurosci.*, 4, 813, 2001.
45. Tronel, S. and Sara, S.J., Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval, *Learn. Mem.*, 9, 105, 2002.
46. Gutierrez, R., Tellez, L.A., and Bermudez-Rattoni, F., Blockade of cortical muscarinic but not NMDA receptors prevents a novel taste from becoming familiar, *Eur. J. Neurosci.*, 17, 1556, 2003.
47. Bahar, A. et al., The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it, *Eur. J. Neurosci.*, 17, 1527, 2003.
48. Lee, J.L.C., Everitt, B.J., and Thomas, K.L., Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation, *Science*, 304, 839, 2004.
49. Duvarci, S. and Nader, K., Characterization of fear memory reconsolidation, *J. Neurosci.*, 24, 9269, 2004.
50. Alberini, C.M., Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.*, 28, 51, 2005.
51. **Domjan, M.**, Attenuation and enhancement of neophobia for edible substances, 151, 1977.



52. Bermudez-Rattoni, F., Molecular mechanisms of taste-recognition memory, *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 209, 2004.
53. Rodriguez-Ortiz, C.J. et al., Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained, *Learn. Mem.*, 12, 533, 2005.
54. Morris, R.G. et al., Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature*, 297, 681, 1982.
55. Rodriguez-Ortiz, C.J. et al., Spatial memory undergoes post-retrieval consolidation only if updating information is acquired, presented at 35th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., November 12-16, 2005, 654.20.
56. Morris, R.G. et al., Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval, *Neuron*, 50, 479, 2006.
57. Abraham, W.C. and Robins, A., Memory retention: the synaptic stability versus plasticity dilemma, *Trends Neurosci.*, 28, 73, 2005.
58. Frenkel, L., Maldonado, H., and Delorenzi, A., Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II, *Eur. J. Neurosci.*, 22, 1757, 2005.
59. Gordon, W.C. and Spear, N.E., Effect of reactivation of a previously acquired memory on the interaction between memories in the rat, *J. Exp. Psychol.*, 99, 349, 1973.
60. Summers, M.J., Crowe, S.F., and Ng, K.T., Modification of a weak learning experience by memory retrieval in the day-old chick, *Behav. Neurosci.*, 114, 713, 2000.
61. Summers, M.J., Crowe, S.F., and Ng, K.T., Memory retrieval in the day-old chick: a psychobiological approach, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27, 219, 2003.
62. Bures, J., Bermudez-Rattoni, F., and Yamamoto, T., *Conditioned Taste Aversion: Memory of a Special Kind*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
63. Daly, K.C. et al., Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10476, 2004.
64. Marr, D., Simple memory: a theory for archicortex, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 262, 23, 1971.
65. Sutherland, G.R. and McNaughton, B., Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 180, 2000.
66. Frankland, P.W. and Bontempi, B., The organization of recent and remote memories, *Nat. Rev. Neurosci.*, 6, 119, 2005.
67. Bouton, M.E., Context and behavioral processes in extinction, *Learn. Mem.*, 11, 485, 2004.
68. Lattal, K.M. and Abel, T., Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 4667, 2004.
69. Power, A.E. et al., Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of re-exposure duration, *Learn. Mem.*, 13, 27, 2006.
70. Prado-Alcala, R.A. et al., Amygdala or hippocampus inactivation after retrieval induces temporary memory deficit, *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2006, in press.
71. Tronel, S., Milekic, M.H., and Alberini, C.M., Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms, *PLoS. Biology*, 3, e293, 2005.