



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**DEPENDENCIA DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN
EL HIPOCAMPO PARA LA ACTUALIZACIÓN DE
INFORMACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. PAOLA GARCÍA DE LA TORRE

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MÉXICO, D.F.

Agosto, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fue dirigido por el Dr. Federico Bermúdez Rattóni; con el apoyo económico del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 42657A-1 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN220706-3.

Quiero agradecer al Dr. Federico Bermúdez Rattóni por la oportunidad de ser parte de este proyecto, por ayudarme y guiarme en el transcurso.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, la Dra. María Rosa Ávila Costa y la Dra. Diana Escalante Alcalde por sus comentarios y apoyo. Y al Dr. Víctor Ramírez Amaya y la Dra. Martha L. Escobar por la revisión de esta tesis.

Un agradecimiento especial a Carlos Rodríguez, Luis Arreguín, Paulina Cruz, Sinuhé Muñoz y Eduardo Benavides. Gracias a Oreste Carvajal y a Adriana Morales por facilitar tanto mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias mamá por guiarme en el camino y llenarlo de magia; papá por enseñarme el valor de la vida y por introducirme en el mundo de la ciencia. Gracias Ale por conocerme tanto y contestarme todas mis dudas, Juan José por darle buen humor a mi vida y por tus fuertes abrazos; Paola por tu compañía y tus detalles; y mil gracias Kiara por cuidarme siempre y por ser quien eres.

Por supuesto este trabajo no hubiera sido posible sin la compañía, sabiduría y consejo de mis abuelos y la presencia atinada de Marisol.

Isa, Paty, Mafer y Caro gracias por su amistad y apoyo. Víctor, gracias por ser parte de mi vida.

Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida y con un conocimiento, un sentido, de la maravillosa estructura de la existencia, al igual que del humilde intento por entender una pequeña porción de la Razón que se manifiesta a sí misma en la naturaleza.

Albert Einstein

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes	3
Memoria	3
Consolidación	3
Hipocampo	4
Reconsolidación	9
Extinción	13
Hipótesis y Objetivos	16
Hipótesis	16
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Metodología	18
Resultados	23
Inhibición de la síntesis de proteínas durante la adquisición	23
Inhibición de la síntesis de proteínas durante la evocación. Reconsolidación ...	25
Inhibición de la síntesis de proteínas durante la extinción	30
Discusión	31
Bibliografía	35

RESUMEN

La memoria requiere de la síntesis de proteínas para su almacenamiento a largo plazo, este proceso se conoce como consolidación y se proponía que sólo ocurría una vez para cada trazo de memoria. Ahora hay evidencia que sugiere que hay otra ola de síntesis de proteínas, dependiente de evocación, en la que la memoria es lábil y susceptible a cambios; a este proceso se le denomina reconsolidación. Recientemente se ha visto que la reconsolidación, contrario a lo que indica su nombre, no es una recapitulación fiel de la consolidación, ya que hay evidencia de que los procesos moleculares y las estructuras participantes en ambos procesos difieren en algunas tareas. Una propuesta alternativa es que tanto la reconsolidación como la extinción son procesos de actualización de la memoria que incorporan información relevante a un trazo previamente consolidado. Para evaluar el papel de la síntesis de proteínas en la actualización de un trazo de memoria espacial utilizamos el laberinto acuático de Morris. Se entrenó a las ratas por 5 días y se les inyectó anisomicina o solución vehículo en el hipocampo dorsal antes del entrenamiento en el tercer o quinto día. Al evaluar la memoria, una semana después, sólo en los animales inyectados con anisomicina el tercer día se observó deterioro de la memoria a largo plazo. Cuando se entrenaron animales por 3 (animales entrenados) ó 5 (animales sobreentrenados) días y se les administró anisomicina o solución vehículo antes de una sesión de evocación, los animales inyectados con anisomicina entrenados por 3 días, mostraron un peor desempeño que los inyectados con vehículo. Finalmente, se entrenaron animales por 5 días y se inyectaron antes de 3 ensayos de extinción a los 7 días. Los animales inyectados con anisomicina no extinguieron, mientras que los inyectados con vehículo sí. Estos resultados sugieren que para la adquisición de información actualizada (sea reconsolidación o extinción) en una tarea de memoria espacial, es necesaria la síntesis de proteínas. Nos parece que reconsolidación no es la expresión adecuada para la descripción de este proceso y sugerimos que actualización de la memoria es un término más descriptivo del mismo.

ABSTRACT

Memory requires of protein synthesis to be stored in a long-term, this process is known as consolidation and it was believed to occur only once for each memory trace. Nowadays there is evidence that suggests that another protein synthesis wave takes place in which memory becomes labile and susceptible to changes. This process is dependent on retrieval and is known as reconsolidation. Contrary to its name, it is not a recapitulation of consolidation since there is evidence of the involvement of different molecular processes and structures in consolidation and reconsolidation of different tasks. An alternative proposal is that reconsolidation and extinction are updating processes that introduce relevant information to a consolidated memory trace. To further analyze the role that updated information plays in retrieved spatial memory susceptibility to disruption, we injected anisomycin bilaterally in the dorsal hippocampi of rats. First, rats were trained for 5 days on the Morris water maze task and injected with anisomycin before the third or fifth training session. When memory was assessed a week later, only animals injected on the third training session showed disruption of long-term memory. Furthermore, when animals were trained for either 3 (middle-trained) or 5 (well-trained) days and a week later anisomycin was infused before a reminder session, only middle-trained rats infused with anisomycin showed reduced performance when tested for long-term memory. Finally, animals trained for 5 days and injected with anisomycin 7 days later on an extinction session, performed poorly on a long-term extinction test. These results suggest that for spatial memory tasks acquisition of updated information is a necessary feature to undergo this process. We propose that reconsolidation is not an accurate term because it implies that consolidation happens again. Updating seems to be a more descriptive term to refer to this process.

ANTECEDENTES

Memoria

El aprendizaje y la memoria son propiedades del sistema nervioso que nos permiten adquirir, retener y evocar diferentes tipos de información. Se define al aprendizaje como el proceso por el cual adquirimos nueva información acerca de los eventos que nos rodean y a la memoria como el proceso por el cual retenemos y evocamos dicha información (Bailey *et al*, 1996).

La clasificación de la memoria de acuerdo a su duración se inició con el trabajo de Hermann Ebbinghaus y fue formalizado más adelante por William James. Estos trabajos proponen que la memoria tiene, en base a un curso temporal, al menos dos formas: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. No hay un tiempo específico que separe estos tipos de memoria, pero es claro que la información que se almacena a largo plazo requiere de un proceso de consolidación que la fortalece en el tiempo para volverla un trazo de memoria estable. Este proceso no ocurre en la memoria a corto plazo la cual decae mucho antes en el tiempo.

Consolidación

El término consolidación fue propuesto por Müller y Pilzecker en un estudio reportado en 1900. En su trabajo entrenaron sujetos para memorizar una lista de sílabas pareadas. El día de la prueba se presentaron algunas de las sílabas y el número de sílabas complementarias recordadas se utilizó como medida de memoria. Observaron que había una reducción en el número de las sílabas recordadas cuando una segunda lista de sílabas se les presentaba poco tiempo

después del entrenamiento. Además, entre más tiempo transcurría entre la presentación de las dos listas, menor era el efecto en el desempeño. Concluyeron entonces que la segunda lista interfería de una manera dependiente del tiempo en un proceso que fortalece la memoria, y nombraron a dicho proceso consolidación (Bermúdez-Rattoni, 2007).

La hipótesis de la consolidación de la memoria es hasta ahora la teoría más aceptada para explicar el almacenamiento de información a largo plazo. La visión dominante acerca de la conversión de una memoria de corto plazo (que implica sólo la activación de cascadas de transducción) a una de largo plazo, es que las señales de transducción llegan hasta el núcleo, en donde se lleva a cabo la transcripción. Posteriormente hay traducción del RNA que finalmente lleva a la síntesis de proteínas, transformando alteraciones temporales de la transmisión sináptica en modificaciones persistentes de la arquitectura sináptica. Y es a este proceso al que se le conoce como consolidación celular (Debiec *et al*, 2002).

A principios del siglo XIX, Franz Joseph Gall ofreció la entonces novedosa idea, de que diferentes regiones del cerebro son responsables de distintas funciones psicológicas, incluyendo la memoria (Bermudez-Rattoni, 2007). Ahora se sabe que el hipocampo es la región del cerebro responsable de la consolidación de la memoria espacial para su almacenamiento a largo plazo (Martin y Clark, 2007).

Hipocampo

El hipocampo es una estructura localizada dentro del lóbulo temporal y forma parte del sistema límbico. Se le considera perteneciente a la corteza primitiva o allocorteza. Recibe información sensorial polimodal vía corteza

entorrinal y disfruta de conectividad aferente y eferente con estructuras subcorticales y corticales frontales (Martin y Clark, 2007). La figura 1.1 es un diagrama de esta estructura.

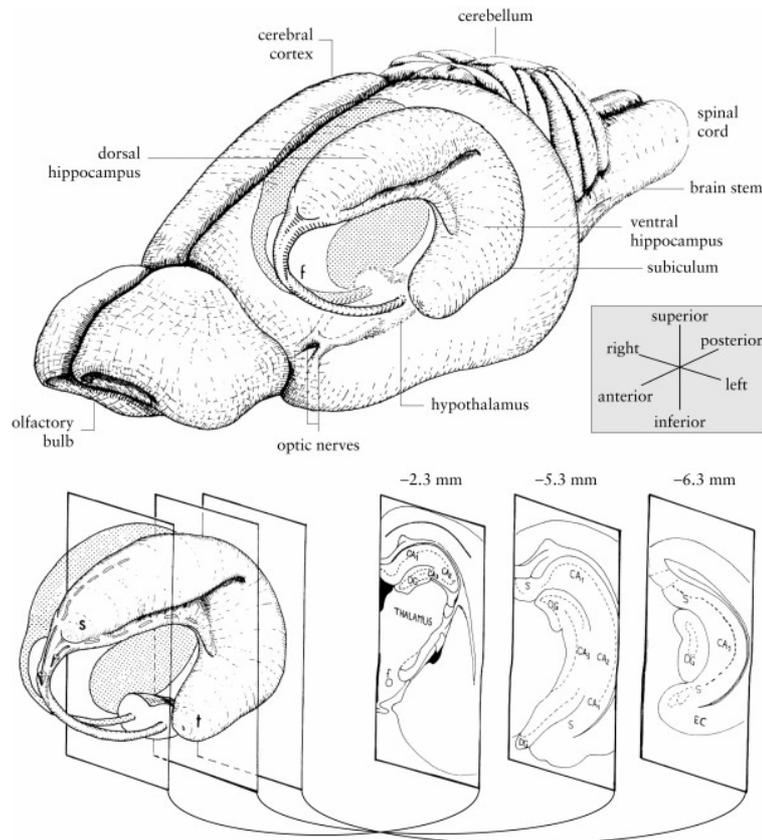


Figura 1.1. Tomado de Cheung y Cardinal, 2005. Diagrama del hipocampo de una rata. Diagramas de cortes coronales del hipocampo de una rata.

Hay evidencia que implica al hipocampo en el procesamiento y almacenaje de la memoria y de la navegación espacial; el daño experimental en el hipocampo de los roedores causa un déficit en el aprendizaje y la memoria en un gran rango de tareas espaciales (Martín y Clark, 2007).

El laberinto acuático de Morris es una tarea muy utilizada para la medición de esta memoria. El laberinto consta de un tanque lleno de agua fría con una plataforma de escape, oculta, a la que tiene que llegar el animal para evitar el agua fría. En el

cuarto hay claves visuales que permiten que el animal se ubique en el espacio y aprenda la posición de la plataforma (la cual es constante) a través de los ensayos. Cada ensayo consiste en colocar al animal en un punto dentro del tanque y dejarlo 60 segundos o hasta que encuentre la plataforma. La adquisición de la memoria se mide por la latencia (el tiempo que tarda la rata en encontrar la plataforma en cada ensayo). La prueba de memoria consta de 60 segundos en el tanque pero sin la plataforma, y la memoria se mide tomando en cuenta el número de cruces que tenga el animal a través del lugar donde se encontraba la plataforma, o el tiempo que pasa en la cuarta parte del tanque en donde estaba la misma.

Animales con lesiones en el hipocampo y entrenados en el laberinto acuático de Morris, pueden nadar normalmente en la tina y aprender a evitar el agua fría, pero tienen dificultades en ubicar la plataforma tanto durante el día del aprendizaje como en la prueba del día siguiente (Bermúdez-Rattoni, 2001).

También se ha reportado en ratas, que la infusión de anisomicina (un bloqueador de la síntesis de proteínas) en el ventrículo lateral con la intención de bloquear la síntesis de proteínas en el hipocampo, 20 minutos antes del entrenamiento, bloquea la adquisición de la memoria en el laberinto acuático de Morris (Meiri y Rosenblum, 1998).

Florian y Rouillet (2004) muestran en sus resultados que la región CA3 del hipocampo es importante en ratones durante la codificación de información espacial y que esta región es crucial para la consolidación de la memoria. En su trabajo utilizan el dietilditionacarbonato (DDC) para quelar los metales pesados intra y extracelulares y así interferir con la transmisión sináptica. Realizaron

inyecciones de DDC o ácido etilendiamin tetra-acético (EDTA) como control ya que aunque también es un quelante no puede penetrar la membrana y por lo tanto no puede quelar metales pesados en el axón. Las inyecciones se realizaron en el hipocampo inmediatamente después de los entrenamientos para interferir con la consolidación de la información espacial.

Como se muestra en la figura 1.2, hay diferencias en el número de cruces por plataformas virtuales de 14 cm. de diámetro en cada cuadrante, siendo el cuadrante blanco (Target) la ubicación original de la plataforma. El grupo control (inyectados con EDTA) pasa significativamente más tiempo en el cuadrante en el que se encontraba la plataforma durante los entrenamientos, señal de que aprendió bien la ubicación de la misma y por lo tanto ejecuta bien la tarea. En cambio, el grupo inyectado con DDC pasa un tiempo similar en todos los cuadrantes, indicando que no hubo consolidación de la tarea por lo que no puede desempeñarla bien el día de la prueba.

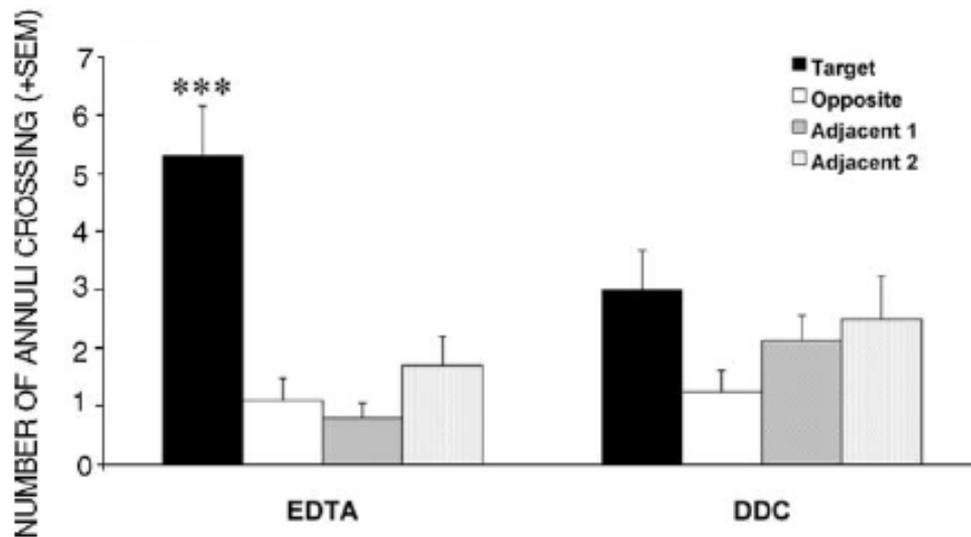


Figura 1.2. Tomado de Florian y Roulet, 2004. Consolidación de la memoria de información espacial. Número de cruces a través de plataformas virtuales de 14cm de diámetro (Number of annuli crossing) en los cuadrantes del laberinto acuático de Morris. El cuadrante blanco (Target) es en donde se encontraba la plataforma originalmente. No hay diferencias en el número de cruces por cada cuadrante en las ratas tratadas con DDC. En cambio las ratas inyectadas con EDTA muestran mayor número de cruces por el cuadrante blanco (Target), índice de mejor memoria.

También se sabe de la existencia de neuronas en el hipocampo que se activan específicamente cuando el animal está en una localización determinada de un ambiente; estas neuronas son células piramidales de la región CA1 y CA3 (Bermúdez-Rattoni, 2001). Y se ha reportado sinaptogénesis (eventos plásticos del sistema nervioso, particularmente cambios en la función y organización de las sinapsis) en las fibras musgosas del hipocampo en una región llamada *stratum oriens*, después de repetidas sesiones de aprendizaje espacial (memoria a largo plazo) en el laberinto acuático de Morris (Ramírez-Amaya *et al*, 1999). Además, se reportó que estos cambios ocurren principalmente en la región dorsal del hipocampo sugiriendo que esta área en particular es importante para la memoria espacial (Ramírez-Amaya *et al*, 2000).

Toda esta evidencia implica al hipocampo en la consolidación de la memoria espacial. Específicamente se han visto cambios plásticos en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo que se correlacionan con el proceso de consolidación. Esto nos lleva a suponer que el hipocampo dorsal puede estar igualmente relacionado con la reconsolidación de la memoria espacial.

Reconsolidación

Hasta hace poco, la visión prevaleciente era que los trazos de memoria se estabilizaban después de un episodio de consolidación celular que ocurre en un periodo de horas hasta días seguido de su adquisición. Ahora se ha visto que después de su evocación, la memoria de largo plazo se activa y vuelve a un estado sensible a los agentes que bloquean la consolidación como son los inhibidores de la síntesis de proteínas. Este periodo post-evocación se conoce como reconsolidación (Przybylski y Sara, 1997).

Los primeros trabajos relacionados con este proceso fueron los de Misanin y colaboradores en 1968 quienes llamaron a este fenómeno amnesia dependiente de una clave (*cue-dependent amnesia*). Después los grupos de Gordon (1977) y Lewis (1979), cada uno con un sistema de experimentación diferente, probaron que durante la evocación la memoria se activa y se vuelve susceptible a ser interrumpida en una manera dependiente del tiempo.

Fue hasta el año 2000 cuando Nader y colaboradores retoman esta línea de investigación utilizando la tarea de condicionamiento al miedo; tarea que consiste en asociar un tono (estímulo condicionado, EC) a un choque eléctrico (estímulo incondicionado, EI). Este condicionamiento se refleja en un cambio en el

comportamiento llamado respuesta condicionada (en este caso, inmovilidad ante la presentación del tono). Observaron que en la evocación hay una reactivación del trazo de memoria y que es susceptible a la inhibición de la síntesis de proteínas. En la figura 1.3 se puede ver que los animales en los que se inhibió la síntesis de proteínas (inyectados con anisomicina 125 μ g/ μ l) inmediatamente después de la evocación, tuvieron un peor desempeño (disminución de la respuesta condicionada, no inmovilidad) el día de la prueba en comparación a los inyectados con vehículo (o una dosis más baja de anisomicina 12.4 μ g/ μ l).

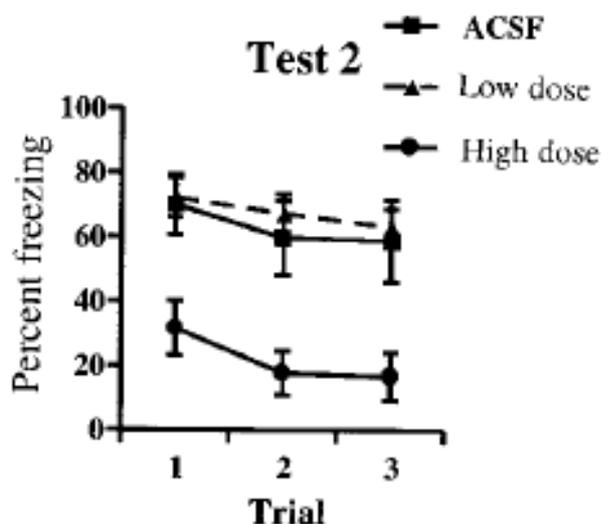


Figura 1.3. Tomado de Nader *et al*, 2000. Se realizó una inyección de anisomicina inmediatamente después de la prueba de memoria (evocación) 24hrs después del entrenamiento. El día siguiente (Test 2) se observa que el grupo inyectado con el inhibidor de síntesis de proteínas (High dose) empeora su desempeño (Percent freezing) en comparación con el grupo inyectado con vehículo (ACSF) o una dosis más baja (Low dose) de anisomicina ($p < 0.01$).

Recientemente se ha sugerido que la reconsolidación, contrario a lo que indica su nombre, no es una recapitulación fiel de la consolidación. Se han encontrado diferencias en los mecanismos moleculares involucrados en la reconsolidación y en la consolidación, así como en las estructuras que los llevan a cabo (Dudai, 2006). Taubenfeld y colaboradores (2001) reportaron que se requiere del factor de

transcripción C/EBP β en el hipocampo para la consolidación de la memoria de inhibición pasiva, pero no en la reconsolidación de la misma.

Rodríguez-Ortiz y colaboradores (2005) mostraron que para la memoria de reconocimiento gustativo a largo plazo, se requiere de la síntesis de proteínas durante la reactivación de la memoria en la corteza insular (CI) para que ésta sea reconsolidada (Figura 1.4 izquierda). En esta tarea la rata incrementa el consumo de sacarina (un sabor nuevo) a medida que pasan las presentaciones del mismo y se vuelve un sabor familiar. Cuando se ha alcanzado una asíntota de desempeño de la tarea, la memoria no se ve afectada por la inhibición de la síntesis de proteínas (Figura 1.4 derecha) ya que no hay información relevante que incorporar. Esto sugiere que la reconsolidación es en realidad un proceso de actualización de la información.

Durante la reconsolidación, la memoria evocada está en un estado en el que información actualizada es incorporada a una memoria previamente consolidada para fortalecer su trazo. Cuando se ha alcanzado una meseta conductual ya no hay actualización del trazo y la inhibición de la síntesis de proteínas no tiene efecto sobre la memoria.

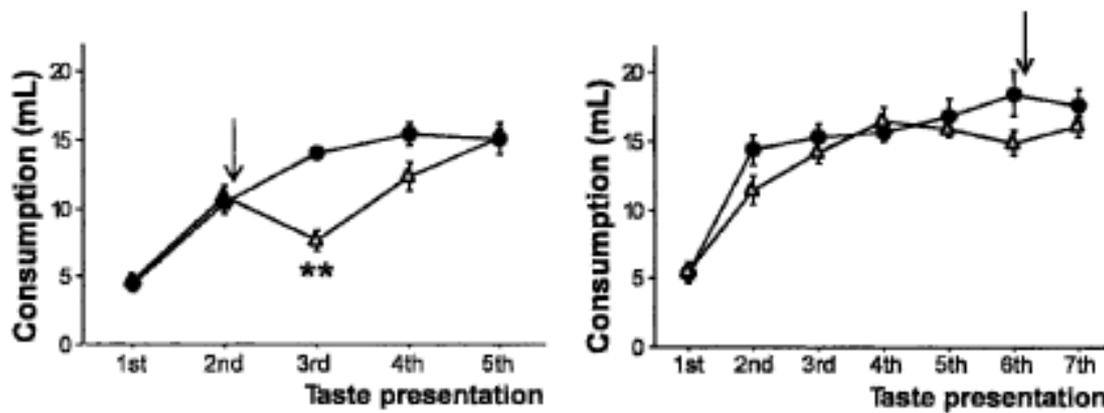


Figura 1.4. Tomado de Rodríguez-Ortiz *et al*, 2005. (izquierda) Realizaron una inyección (flecha) de anisomicina (-△-) o vehículo (-●-), inmediatamente después de la segunda presentación de un sabor (2nd taste presentation) y observaron que se afecta parcialmente la memoria previamente consolidada (consumption) en las inyectadas con anisomicina (** $p < 0.01$) (derecha) En la sexta presentación de sacarina (6th Taste presentation) administraron anisomicina en la CI y no observaron efecto sobre el consumo al día siguiente.

En otro trabajo, Nader y colaboradores (2002), impiden la reconsolidación de la memoria, sin afectar la memoria a corto plazo, con infusiones de anisomicina en el hipocampo inmediatamente después de la evocación (reactivación de la memoria). En este trabajo utilizaron la tarea de condicionamiento del miedo a un contexto (contextual fear conditioning); entrenando a ratas administrando choques eléctricos en un mismo contexto durante la adquisición y midiendo su reacción (porcentaje de inmovilidad). Al inhibir la síntesis de proteínas en el hipocampo justo antes de la sesión de evocación, afectan la reconsolidación de la memoria que se refleja en un menor porcentaje de inmovilidad del animal el día de la prueba de memoria a largo plazo (Fig. 1.5).

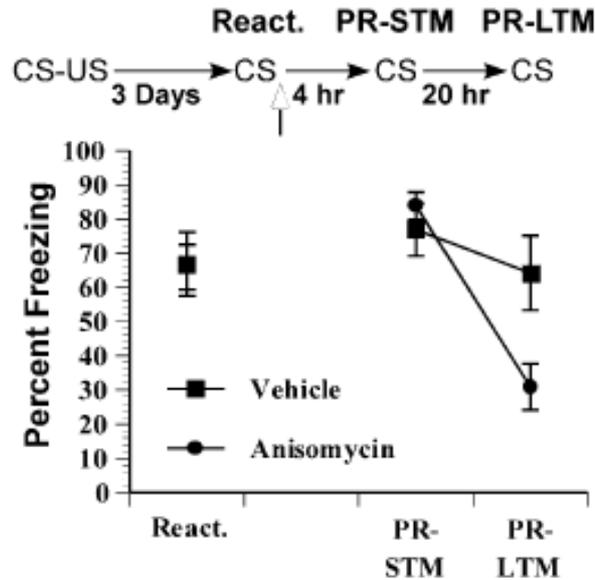


Figura 1.5. Tomada de Nader *et al*, 2002. Al reactivar la memoria e inhibir la síntesis de proteínas (flecha) en el hipocampo inmediatamente después de la evocación (React.), se afecta la reconsolidación de la memoria a largo plazo (PR-LTM) sin afectar la de corto plazo (PR-STM). Los animales inyectados con vehículo (■) tienen un mejor desempeño (Percent Freezing) que los inyectados con anisomicina (●) lo que se refleja en un mayor porcentaje de inmovilidad (Percent Freezing). Esto indica que se afectó la reconsolidación de la memoria.

Extinción

Otro proceso de actualización de la memoria es la extinción. La extinción se da en los condicionamientos de asociación de EC-EI (estímulo condicionado - estímulo incondicionado) como una disminución en la frecuencia o intensidad de una respuesta condicionada debido a la asociación del EC con la ausencia del estímulo incondicionado (no-EI).

Durante la evocación de una memoria de condicionamiento previamente consolidada se suele presentar exclusivamente al estímulo condicionado (EC) para reactivar la memoria. Lo que contribuye a la formación de una segunda memoria que se almacena sin destruir el trazo anterior pero suprimiendo su expresión. Es decir, el trazo EC-EI compite con el trazo EC-noEI por el control del

comportamiento (Pedreira y Maldonado, 2003). Comúnmente para permanecer a largo plazo, la extinción (asociación EC-noEI) requiere de la síntesis de proteínas en la misma región donde se da dicha síntesis para la asociación EC-EI.

Varios estudios han evaluado la relación entre los procesos de reconsolidación y los de extinción. Eisenberg y colaboradores (2003) concluyen que el control del comportamiento depende, en parte, de la intensidad del entrenamiento y del número de ensayos de extinción que se dan en la evocación.

El grupo de Suzuki (2004) reportó posteriormente, con estudios de condicionamiento al miedo, utilizando ratas, que una presentación prolongada del EC durante la evocación lleva a la extinción (Figura 1.5 derecha) y una exposición corta al EC lleva a la reconsolidación (Figura 1.5 izquierda); confirmando así, que el número de ensayos está involucrado en el control del comportamiento por cualquiera de los trazos.

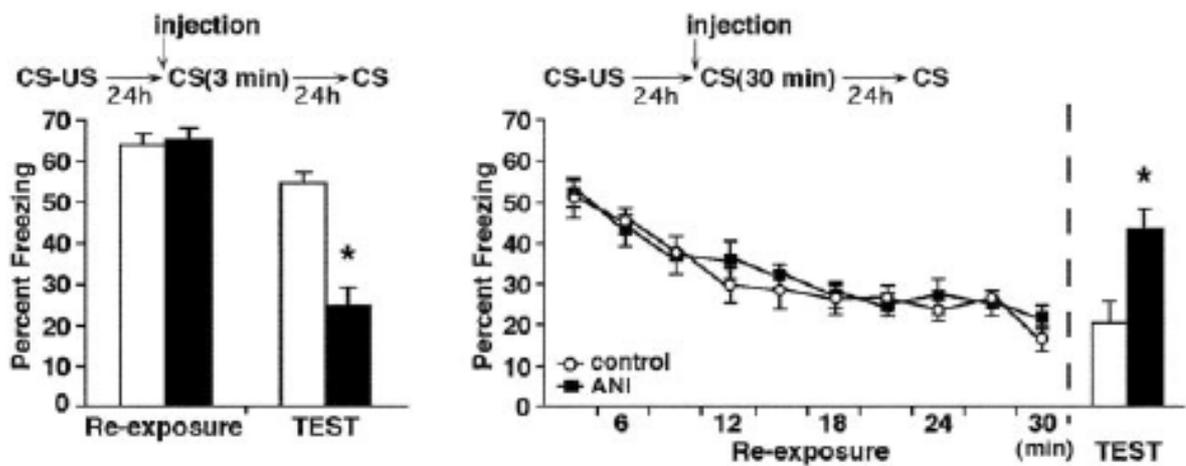


Figura 1.5. Tomado de Suzuki *et al*, 2004. Extinción y Reconsolidación (* $p < 0.05$). (izquierda) Un tiempo de exposición corto (3min) al EC (CS) durante la evocación (Re-exposure) produce reconsolidación y puede ser afectado por la inhibición de la síntesis de proteínas como se observa en la prueba (TEST) en donde los animales inyectados con anisomicina (barra negra) se desempeñan peor (menor porcentaje de inmovilidad) a los inyectados con vehículo (barra blanca). (derecha) Un tiempo de exposición largo (30min) al EC durante la evocación (Re-exposure) lleva a la extinción, y su consolidación puede ser evitada al inhibir la síntesis de proteínas como se observa en la prueba (TEST) en donde se observa que los inyectados con vehículo (barra blanca) sí extinguen (mayor porcentaje de inmovilidad) y los inyectados con anisomicina (barra negra) no.

De estos estudios se concluye que la fortaleza de la memoria y la duración de la evocación (Pedreira, 2003; Suzuki, 2004), son aspectos decisivos y directamente relacionados con la susceptibilidad de la memoria a ser afectada después de su reactivación (evocación).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La consolidación de la memoria depende de la síntesis de proteínas para su almacenamiento a largo plazo. Para la memoria espacial se sabe que es el hipocampo dorsal la estructura responsable de la consolidación. Para evaluar la actualización de la memoria espacial se trabajó con el laberinto acuático de Morris ya que es una tarea común para la medición de este tipo de memoria.

La actualización de la memoria ocurre cuando hay información que integrar a un trazo previamente consolidado. Tanto la reconsolidación como la extinción son procesos de la memoria que integran nueva información, por lo tanto, actualizan la memoria. Ambos procesos requieren de la síntesis de proteínas para su mantenimiento a largo plazo. Por ello en este trabajo se utilizó la anisomicina como inhibidor de la síntesis de proteínas.

Ya sabemos que la actualización de la memoria ocurre en la memoria de reconocimiento gustativo y que la estructura responsable de este proceso es la corteza insular. Los experimentos realizados en esta tesis nos permitirán generalizar el modelo de actualización de la memoria dependiente de la síntesis de proteínas.

Hipótesis

Se requiere de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal en una tarea espacial, siempre y cuando exista actualización de la memoria.

Objetivo general

Investigar la dependencia de la síntesis de proteínas en el hipocampo para la actualización de la memoria espacial.

Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal en la reconsolidación de la memoria.
- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal en la extinción de la memoria.
- Analizar el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal en condiciones donde no hay actualización de la memoria espacial.

METODOLOGÍA

Sujetos

Ratas Wistar machos con un peso promedio de 280g obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Cirugía

Se implantaron cánulas de 9mm de largo y 23Ga bilateralmente en la región dorsal del hipocampo (entre CA1 y CA3); en las siguientes coordenadas: AP:-3.6, DV:-2.3, L: +/-3 (Figura 2.1). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (76mg/kg) y xilacina (8mg/kg) antes de la cirugía. Contaron con al menos 7 días de recuperación antes de comenzar con el entrenamiento de la tarea espacial.

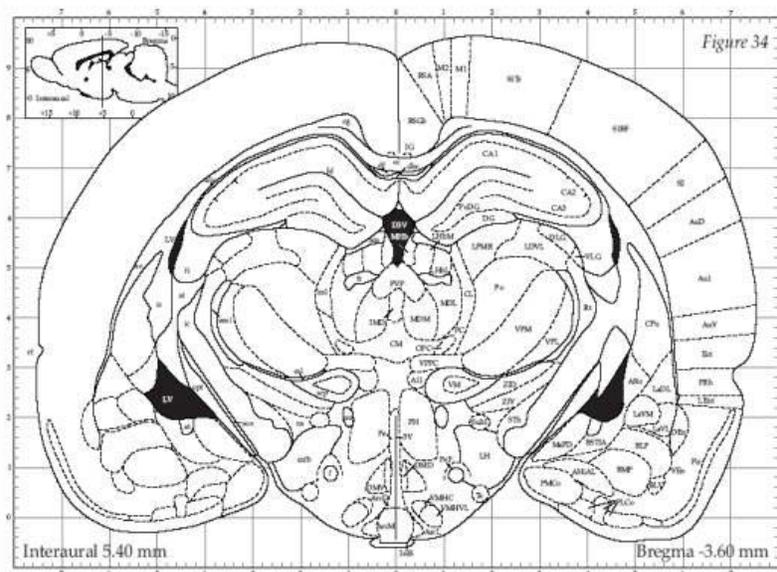


Figura 2.1. Tomado de Paxinos y Watson, 1998. Esquema coronal del cerebro de la rata a la altura antero-posterior del lugar de la implantación de las cánulas.

Tarea espacial: laberinto acuático de Morris

Consta de un tanque circular de 1.5 m de diámetro y 1 m de altura lleno de agua (20-22°C), con una plataforma cuadrada de 12 cm por lado, sumergida 1cm en el agua como se muestra en la figura 2.2. El protocolo usado fue de 10 ensayos por día durante 3 días para las entrenadas o 5 días para las sobreentrenadas. En cada ensayo la rata se colocó en un punto de salida diferente y tuvo como máximo 60 segundos para encontrar la plataforma y subirse en ella, de lo contrario se le guió hasta ella. La rata esperó 30 segundos en la plataforma y 30 segundos fuera del tanque antes del siguiente ensayo. La adquisición de la tarea se midió por el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma en cada ensayo a lo largo de los días de entrenamiento. La prueba de memoria constó de un ensayo de 60 segundos en el mismo tanque pero sin plataforma. La memoria se midió con el número de veces que la rata cruzó por una plataforma virtual de 35 mm de diámetro que se encuentra en el lugar original de la plataforma.

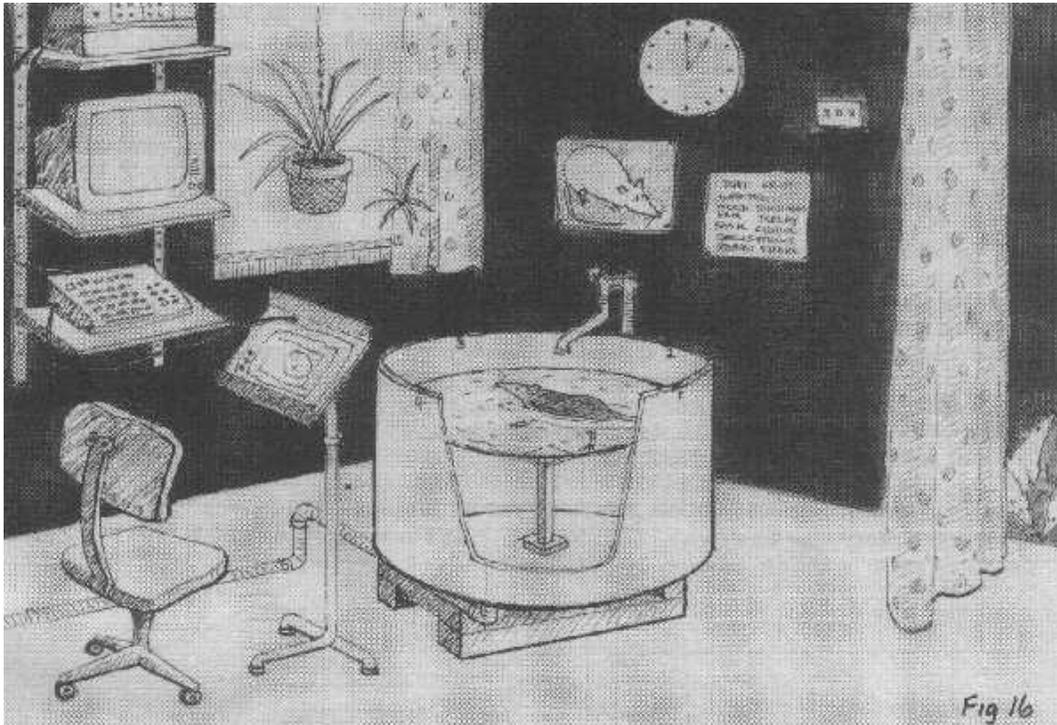


Figura 2.2. Ilustración de Gillian Benett (1993) The Royal Society of New South Wales. Esquema de un laberinto acuático de Morris. Se puede ver que hay una plataforma sumergida en el tanque lleno de agua y que en el cuarto existen varias claves espaciales que le ayudan al animal a ubicarse en el espacio y aprender así la posición de la plataforma.

Reactivos

Anisomicina: bloqueador de la síntesis de proteínas. Inhibe a la enzima peptidiltransferasa, y por lo tanto bloquea la traducción. Se utilizó a una concentración de 100mg/ml, concentración basada en estudios que demuestran efectos sobre la memoria espacial a esta dosis (Meiri y Rosenblum, 1998) disuelta en ASCF. La dosis fue de 1µl/min en cada hemisferio.

ASCF (*Fluido Cefalorraquídeo Artificial, por sus siglas en inglés*): NaCl 125mM, KCl 5mM, NaH₂PO₄ H₂O 1.25mM, MgSO₄ 7H₂O 1.5mM, NaHCO₃ 26mM, glucosa 10mM, CaCl₂ 2.5mM a un pH de 7.4.

Inyecciones

Inyecciones bilaterales en el hipocampo dorsal, 1µl por hemisferio en 1min y se dejó el inyector dentro 1 minuto más para la difusión del líquido. Todas las inyecciones se realizaron 20 minutos antes de cualquier tarea espacial.

Procedimientos Conductuales

○ *Experimento 1*

Las ratas fueron entrenadas durante 5 días en el laberinto acuático de Morris, cada día constó de 10 ensayos. A un grupo se le realizó la inyección en el tercer día del entrenamiento y al otro en el quinto día. La prueba de memoria se realizó 7 días después del último entrenamiento.

○ *Experimento 2*

El entrenamiento de las ratas fue de 3 (ratas entrenadas) ó 5 días (ratas sobreentrenadas). Las inyecciones se realizaron 20 minutos antes de la evocación (un ensayo de 60s, sin plataforma) a los 7 días del entrenamiento. La prueba de memoria fue 7 días después de la evocación de cada grupo.

Se realizó además un control en el cual a ratas entrenadas se les hizo la inyección el día de la evocación en un cuarto diferente (otro contexto) al del laberinto acuático. A este grupo también se le realizó una prueba a los 7 días.

○ *Experimento 3*

Se entrenó a las ratas 3 ó 5 días y 7 días después del último entrenamiento, se les sometió a 3 ensayos de extinción que constaron de un minuto en el tanque sin plataforma y un minuto de descanso entre cada ensayo. La prueba de memoria se

realizó a los 7 días de la extinción y la inyección se realizó 20 min antes del primer ensayo de extinción.

Histología

Al final de los experimentos, las ratas se perfundieron con solución salina (NaCl al 0.87%) y se extrajeron los cerebros. Secciones de 40 μ m de ancho se tiñeron de violeta de cresilio y fueron analizadas en el microscopio de luz para observar la localización de las cánulas.

Análisis de datos

Los experimentos se video grabaron usando el sistema de rastreo *chromotrack* (San Diego Instruments). Las latencias de llegada a la plataforma se utilizaron como medida de aprendizaje durante el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris. Para la evocación y sesiones de prueba se usó como medida de memoria el número de cruces sobre una plataforma virtual con un diámetro de 35 cm ubicada en la zona donde se encontraba la plataforma original. Se evaluó la velocidad de nado para descartar efectos de los fármacos sobre la actividad motora de los animales.

Análisis estadístico

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

RESULTADOS

Inhibición de la síntesis de proteínas durante la adquisición (Exp. 1)

Para evaluar la participación de la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal en la adquisición de la tarea, se realizaron dos inyecciones a grupos independientes durante el entrenamiento; un grupo se inyectó el tercer día del entrenamiento y el otro el quinto día. En la figura 3.1 se observa que las ratas inyectadas con anisomicina en el tercer día, muestran un déficit en su desempeño comparadas con el grupo control. A los 7 días se realizó una prueba de memoria a largo plazo en la que los grupos de las ratas inyectadas en el quinto día se comportaron de manera similar, mientras que las ratas inyectadas el tercer día mostraron diferencias ($P < 0.05$) entre grupos (Figura 3.2); esto es, los animales inyectados con anisomicina tuvieron un peor desempeño.

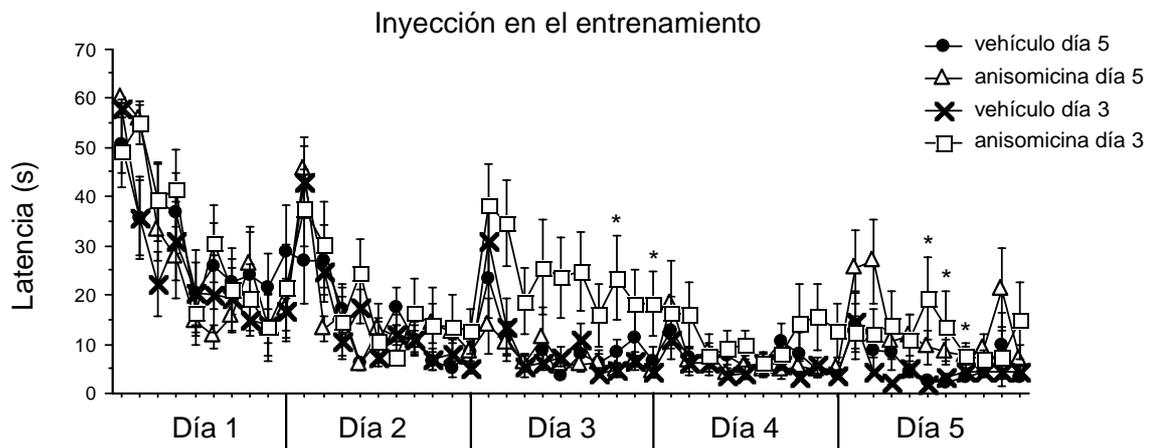


Figura 3.1. Inyección de vehículo o anisomicina antes del primer ensayo el día 3 (✱, ▲) o del día 5 (●, □) del entrenamiento. El eje y muestra la latencia (tiempo que tarda el animal en llegar a la plataforma) y el eje x muestra los 10 ensayos de cada día de entrenamiento. Hubo diferencias ($*p < 0.05$) entre las ratas inyectadas con vehículo y las inyectadas con anisomicina el tercer día (ensayos 8 y 10). Asimismo hay diferencias ($*p < 0.05$) el día de la inyección entre las ratas inyectadas con anisomicina o vehículo el día 5 (ensayos 5, 6 y 7).

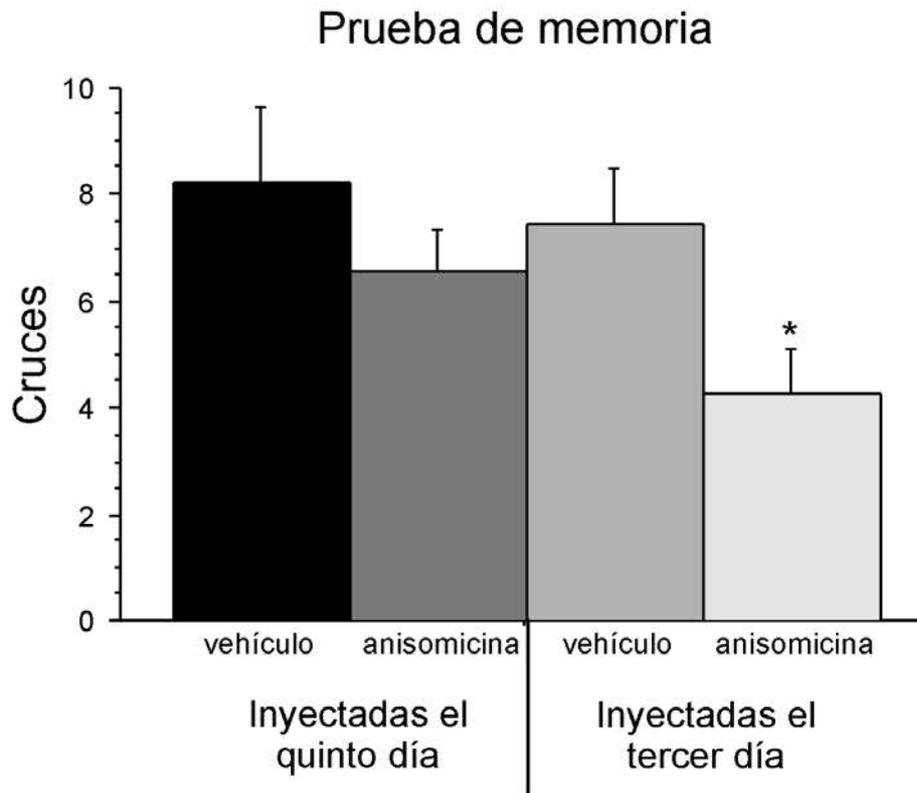


Figura 3.2. Prueba de memoria 7 días después del último entrenamiento. El eje y muestra el número de cruces (a través de una plataforma virtual de 35cm) que realizaron los animales en 60seg. Las ratas inyectadas con anisomicina en el quinto día se comportaron de manera similar a su vehículo pero las inyectadas el tercer día con anisomicina tienen un peor desempeño (* $p < 0.05$) comparadas con su vehículo.

Ya que la síntesis de proteínas es necesaria para la estabilización de un trazo de memoria en el largo plazo, esperábamos afectar la consolidación de la memoria viéndolo como un efecto en el desempeño al día siguiente de la administración de la droga, mas no esperábamos ver diferencias de desempeño entre grupos el día de la inyección. Estas diferencias pueden deberse a efectos inespecíficos de la anisomicina, pero los resultados de la prueba de memoria a los 7 días del entrenamiento indican que estamos afectando, además, la estabilización del trazo de memoria a largo plazo. Las ratas entrenadas e inyectadas con el inhibidor de síntesis de proteínas en el tercer día no se desempeñaron de manera similar a su respectivo grupo control el día de la prueba porque se afectó la estabilización de la

memoria en el tercer día. Mientras que las inyectadas el quinto día no muestran esta diferencia.

Inhibición de la síntesis de proteínas durante la evocación.

Reconsolidación (Exp. 2)

La evidencia actual indica que la reconsolidación es dependiente de la evocación de la memoria (Tronson y Taylor, 2007). Por ello para evaluar el papel de la síntesis de proteínas en este proceso se entrenó a las ratas en el laberinto acuático de Morris durante 3 (entrenadas) ó 5 (sobrentrenadas) días (Fig. 3.3) y se realizó un ensayo de evocación 7 días después del último ensayo del entrenamiento.

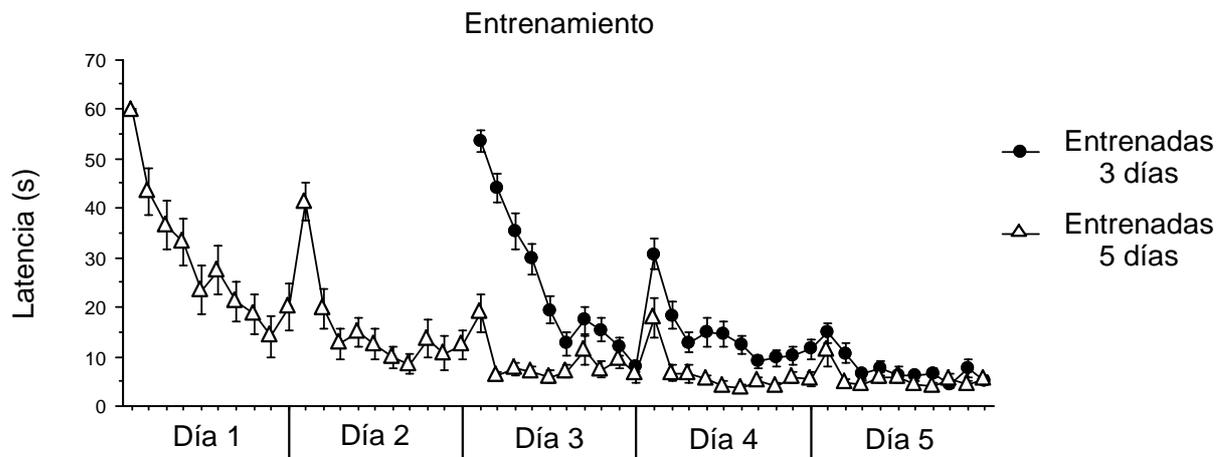


Figura 3.3. Entrenamiento de las ratas en el laberinto acuático de Morris. Un grupo se entrenó por 3 días (●) y el otro por 5 días (▲). Cada día constó de 10 ensayos de entrenamiento. El eje y de la gráfica muestra la latencia (tiempo que tardó la rata en llegar a la plataforma) en segundos y el eje x muestra los 10 ensayos de cada día de entrenamiento.

El efecto de la inyección intrahipocampal antes de la evocación se muestra en la figura 3.4. Otra vez observamos un peor desempeño en los animales inyectados con anisomicina comparados con su vehículo. Esto es claro en los animales

entrenados por 5 días ya que, aunque no alcanza una diferencia significativa, observamos la misma tendencia en las ratas entrenadas por 3 días.

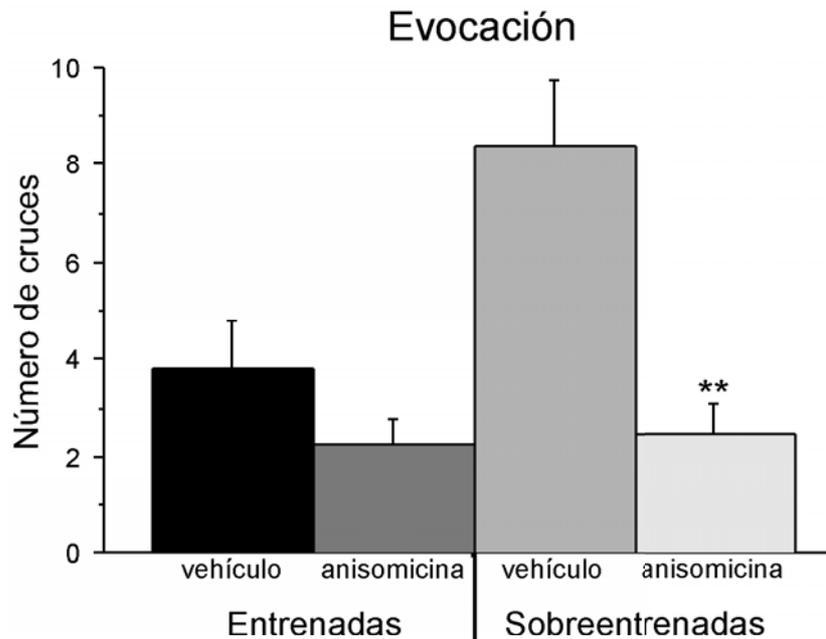


Figura 3.4. Ensayo de evocación. Se realizó la inyección de anisomicina 20min antes del ensayo y se observaron diferencias significativas (** $p < 0.01$) entre los grupos de las ratas sobrentrenadas. Las ratas inyectadas con anisomicina tuvieron un peor desempeño que las inyectadas con vehículo.

En la figura 3.5 observamos que el día de la prueba de memoria (7 días después a la evocación) existen diferencias significativas en el número de cruces entre los grupos de ratas entrenadas ($P < 0.05$), pero no entre los grupos de las ratas sobrentrenadas. Así se confirma la teoría de que al alcanzar la meseta conductual, ya no se puede afectar el trazo de memoria inhibiendo la síntesis de proteínas aún cuando ésta haya sido evocada (Rodríguez-Ortiz *et al*, 2005). Una explicación a este resultado es que ya no hay información relevante para incorporar al trazo previamente consolidado y por lo tanto no existe actualización de la memoria.

Prueba de memoria

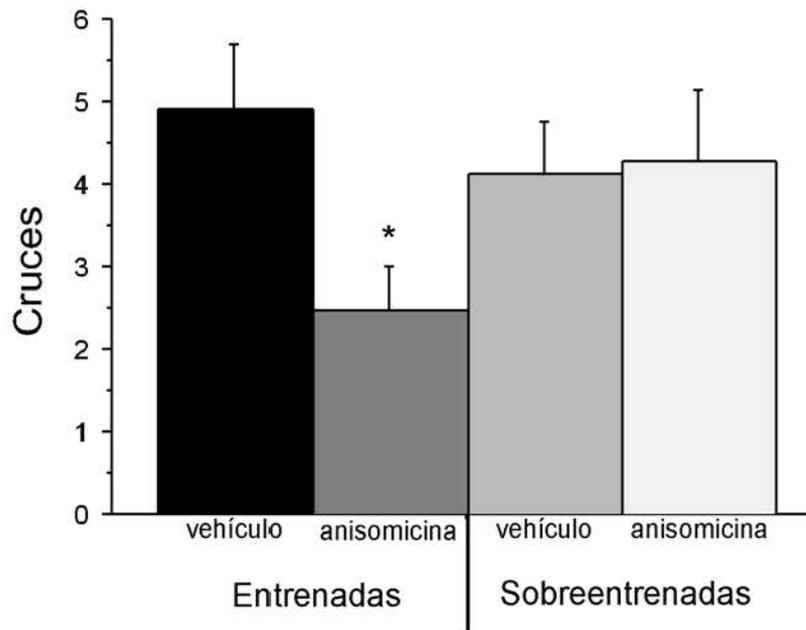


Figura 3.5. Prueba de memoria 7 días después de la evocación. Hay diferencias ($*p < 0.05$) entre los grupos de ratas entrenadas pero no entre las ratas sobreentrenadas. Las ratas entrenadas inyectadas con anisomicina el día de la evocación tienen un peor desempeño que las inyectadas con vehículo.

Para corroborar esta hipótesis, se realizó un control de este experimento en el que se inyectó a ratas entrenadas el día de la evocación en un cuarto distinto al utilizado durante el entrenamiento, evitando así la evocación de la memoria. No hubo diferencias significativas entre los grupos el día de la prueba (Figura 3.6), lo que nos lleva a pensar que, en efecto, en el experimento anterior afectamos la reconsolidación de la memoria al inhibir la síntesis de proteínas y que este proceso es dependiente de evocación. Por lo tanto, no se trata de una ola de síntesis de proteínas post-adquisición requerida para la consolidación. Estos datos también nos indican que el efecto observado en el largo plazo se debe a la inhibición de la síntesis de proteínas y no por el efecto inespecífico de la droga observado el día de la inyección.

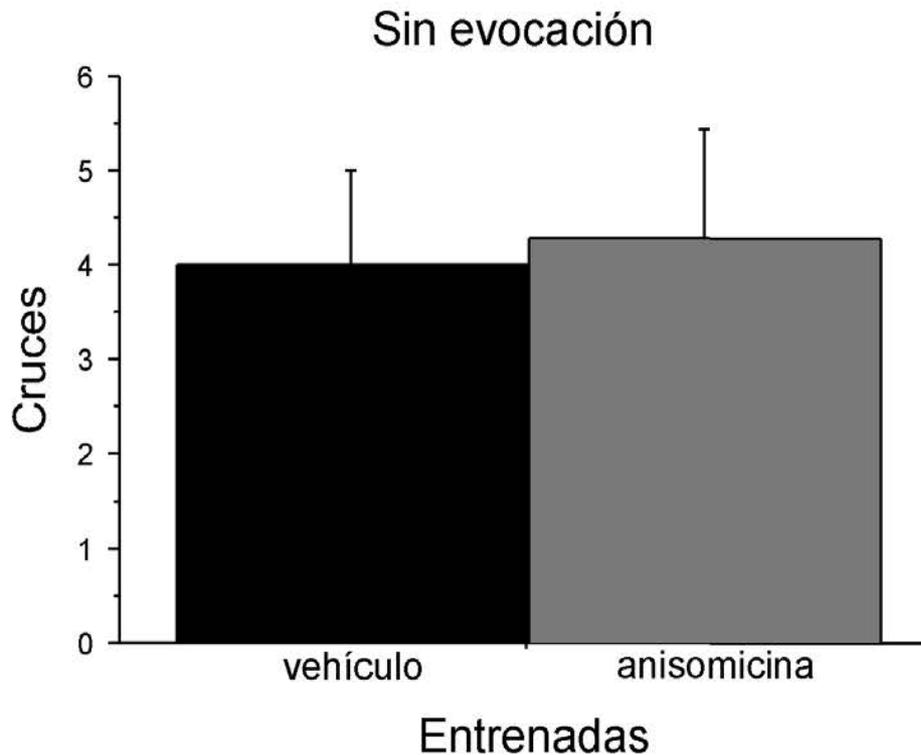


Figura 3.6. Prueba de memoria 14 días después del último entrenamiento. Animales inyectados en el séptimo día después del entrenamiento en un cuarto distinto para evitar la evocación. No hay diferencias significativas entre grupos. El número de cruces (a través de una plataforma virtual de 35cm) es similar en ambos grupos.

Estos resultados apoyan la teoría de que las memorias dependientes de hipocampo pasan por una reconsolidación celular al ser reactivadas por la evocación (Nader, 2000; Pedreira *et al*, 2003). Sin embargo, de nuestros resultados se concluye además que este proceso se da siempre y cuando haya actualización de la información (Rodríguez-Ortiz *et al*, 2005).

Inhibición de la síntesis de proteínas durante la extinción (Exp. 3)

Otra forma de actualizar la memoria es la extinción de la misma. La creación de una nueva asociación de la misma tarea. Para provocar la extinción en esta tarea, quitamos la plataforma del tanque para que el animal aprendiera que ya no hay plataforma. La extinción consiste en incorporar esta nueva información al

trazo de memoria previamente consolidado y cambiar la asociación de los estímulos. Se requiere de la síntesis de proteínas para poder consolidar la nueva asociación.

En este experimento se sometió a ratas sobreentrenadas a 3 ensayos de extinción 7 días después del entrenamiento (Fig. 3.7). El día de la prueba, 7 días después de las sesiones de extinción, se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$) como se puede ver en la figura 3.8. Estas diferencias sugieren que se bloquea la consolidación de la extinción al inhibir la síntesis de proteínas ya que los animales inyectados con anisomicina no extinguieron la memoria mientras que los inyectados con vehículo sí.

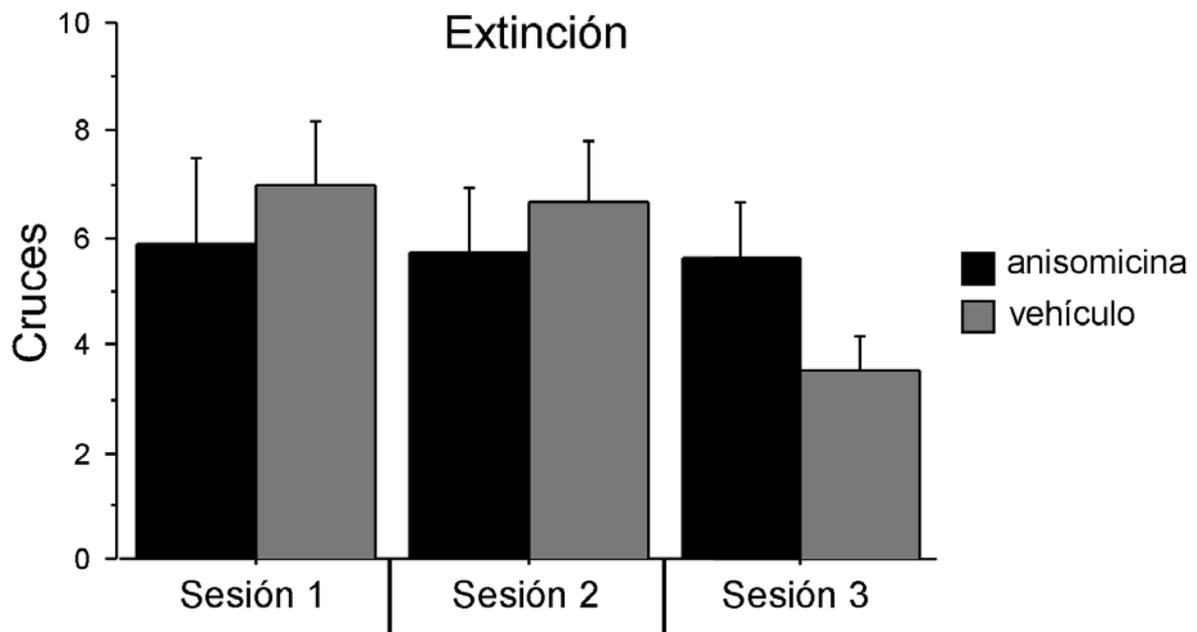


Figura 3.7. Extinción. Se realizaron tres sesiones de extinción (60seg cada una sin plataforma) 7 días después del último entrenamiento. No hay diferencias significativas entre los grupos a lo largo de las tres sesiones. El eje y muestra el número de cruces (a través de una plataforma virtual de 35cm) en cada sesión.

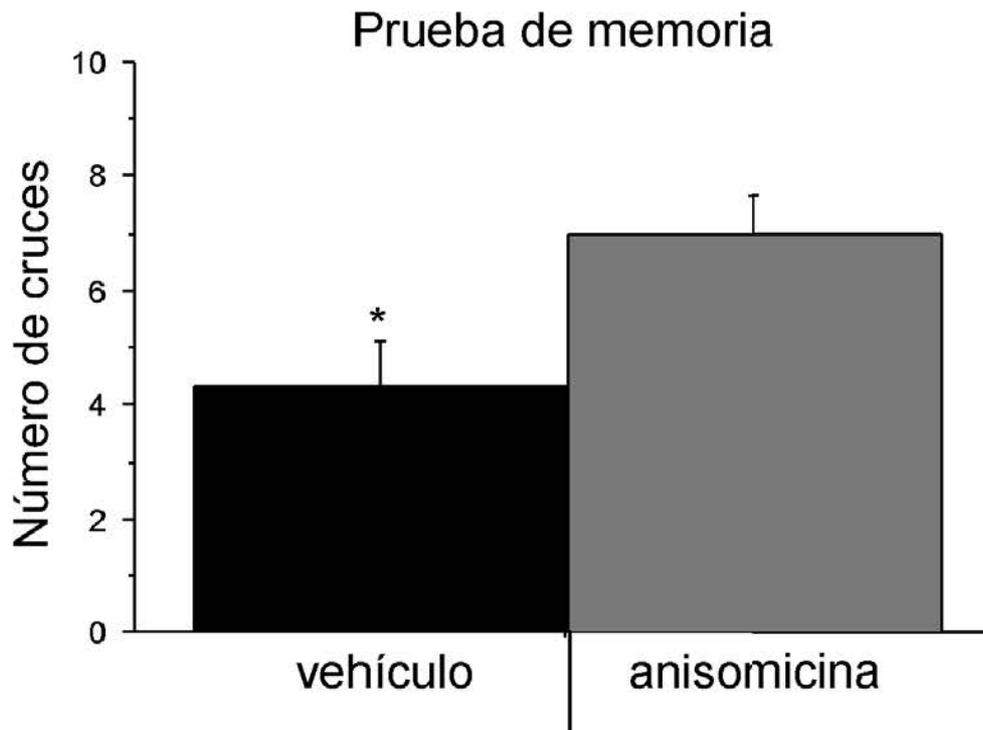


Figura 3.8. Prueba de memoria 7 días después de las sesiones de extinción. El eje y muestra el número de cruces (a través de una plataforma virtual de 35cm). Hay diferencias significativas entre los grupos (* $p < 0.05$). El grupo inyectado con anisomicina muestra una menor extinción que el inyectado con vehículo.

Al aumentar el número de ensayos sin plataforma (Suzuki *et al*, 2004; Eisenberg *et al*, 2003) pudimos observar la extinción de la memoria. Inhibiendo la síntesis de proteínas evitamos que este proceso se llevara a cabo aún y cuando las ratas ya habían llegado a una meseta conductual de la tarea ya que durante los ensayos de extinción hubo información relevante que añadir al trazo de memoria previamente consolidado. Por ello podemos concluir que la extinción es una forma de actualización de la memoria que requiere de la síntesis de proteínas para ser consolidada. Por tratarse de una nueva asociación de la misma tarea, no importa que los animales hayan alcanzado la meseta conductual.

DISCUSIÓN

La anisomicina es la droga más utilizada hoy en día para inhibir la síntesis de proteínas y sus efectos en la consolidación de la memoria han sido ampliamente reportados. La infusión de anisomicina en el hipocampo afecta la consolidación de la memoria posiblemente por la inhibición de la síntesis de proteínas y su efecto se observa al día siguiente de la infusión y se refleja en un peor desempeño de la tarea (Quevedo *et al*, 1999). Por lo tanto, nosotros esperábamos que el efecto de la anisomicina se reflejara el día de la prueba mas no el día de la inyección.

Hasta ahora no sabemos qué es lo que ocasiona el efecto inespecífico que observamos cuando se administró la droga y que se reflejó en un peor desempeño de la tarea el día de la inyección. La anisomicina no sólo inhibe la síntesis de proteínas sino que también es agonista de cinasas que inducen a genes de expresión temprana. El efecto de la anisomicina el día de la inyección puede deberse a una desregulación en estas cinasas que deriva en una interrupción transitoria del desempeño de los animales.

Para evitar este efecto, se intentó realizar la inyección después del entrenamiento o de la evocación. Sin embargo hay antecedentes de que la anisomicina no afecta la consolidación de la memoria en el laberinto acuático de Morris si es inyectada inmediatamente después o una hora antes de las sesiones de entrenamiento (Meiri y Rosenblum, 1998). Nuestros resultados

concuerdan con estos datos ya que no obtuvimos efecto al inyectar después del entrenamiento o de la sesión de evocación (datos no mostrados).

El proceso conocido como reconsolidación parece ser una modificación de la memoria cuando ésta es evocada. A partir de un proceso dependiente de síntesis de proteínas se integra información relevante a la memoria de largo plazo. La reconsolidación podría ser el proceso mediante el cual un trazo de memoria es modificado y estabilizado para crear una memoria actualizada.

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que, como sucede en la memoria de reconocimiento gustativo (Rodríguez-Ortiz *et al*, 2005), en este modelo de aprendizaje, la memoria espacial puede ser modificada durante la evocación siempre y cuando se esté integrando información actualizada a la memoria de largo plazo. Esta modificación es dependiente de la síntesis de proteínas y al parecer tiene la función de mantener la actualización a largo plazo.

Morris y colaboradores (2006) han trabajado también con la participación del hipocampo en la reconsolidación de la memoria espacial. Este grupo afectó la reconsolidación de la memoria utilizando el laberinto acuático de Morris pero realizando las inyecciones de anisomicina después del ensayo de evocación. Aún cuando el protocolo difiere en el número de ensayos y días de entrenamiento, llegan a la conclusión, en congruencia con nuestros resultados, de que la síntesis de proteínas no es necesaria cuando la tarea ha llegado a una asíntota de aprendizaje pero sí cuando se adquiere nueva información y que es durante la evocación cuando la memoria es lábil.

En sus experimentos no lograron evitar la consolidación de la extinción con la inhibición de la síntesis de proteínas. En su protocolo el número de sesiones de extinción fue mayor, realizaron 8 ensayos de extinción antes de la inyección de anisomicina. Podría ser que tantos ensayos llevaran a una meseta conductual con la nueva asociación de estímulos, y que la ventana de síntesis de proteínas necesaria para la consolidación de la extinción hubiera empezado antes de que se administrara el inhibidor de la síntesis de proteínas.

Nuestro protocolo sólo consta de tres ensayos de extinción (Fig.3.7) por lo que todavía podría haber información para ser incorporada al trazo de memoria. Pudimos afectar la consolidación de la extinción porque el efecto de la anisomicina interrumpe la ola de síntesis de proteínas necesaria para dicho proceso.

Tanto la reconsolidación como la extinción son procesos que integran información nueva a un trazo previamente consolidado. Estos procesos difieren en que el primero fortalece la asociación ya consolidada y el segundo cambia la asociación de los estímulos en la tarea. Ambos son procesos que actualizan la memoria de largo plazo y requieren de la síntesis de proteínas.

La propuesta de que la memoria ya consolidada se vuelve lábil en la evocación ha sido apoyada por varios autores (Nader, 2000; Rodríguez-Ortiz *et al*, 2005; Rossato *et al*, 2006; Morris *et al*, 2006) y se ha llamado a este proceso reconsolidación. Sin embargo, con los trabajos publicados hasta ahora, se

concluye que la reconsolidación no es una recapitulación fiel de la consolidación ya que hay diferencias en los eventos celulares (Taubenfeld, 2001) y las estructuras que llevan a cabo estos procesos (Dudai, 2007).

Nosotros sugerimos que la reconsolidación es necesaria cuando hay actualización de la información de una memoria previamente consolidada. Este proceso fortalece o cambia la información del trazo de memoria y por eso, al alcanzar la meseta conductual, cuando ya no hay más información que pueda ser incorporada, la memoria no se vuelve susceptible a la inhibición de la síntesis de proteínas ya que no hay actualización de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey C.H., Bartsch D., Kandel E.** (1996) *Toward a molecular definition of long-term storage.* Proc Natl Acad Sci USA 93:13445-13452.
- Bermúdez Rattoni F., Prado Alcalá R.** (2001) *Memoria.* Editorial Trillas S.A. de C.V., México.
- Bermudez-Rattoni F.** (2007) *Neural plasticity and Memory.* Editorial CRC Press Taylor & Francis Group, E.E.U.U.A.
- Dudai Y.** (2006) *Reconsolidation: the advantage of being refocused.* Current Opinion in Neurobiology 16:174-178.
- Debiec J., LeDoux J., Nader K.** (2002) *Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus.* Neuron 36:527-238.
- Cheung T.H., Cardinal R.N.** (2005) *Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats.* Bio Med Central Neuroscience 13:6(1):36.
- Eisenberg M., Kobilov T., Berman D., Dudai Y.** (2003) *Stability of Retrieved Memory: Inverse Correlation with Trace Dominance.* Science 301:1102-1104.
- Florian C., Roulet P.** (2004) *Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice.* Behavioural Brain Research 154:365-374.
- Gordon W.** (1977) *Suceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon.* Physiol Behaviour 18:95
- Lewis D.J.** (1979) *Psychobiology of active and inactive memory.* Psychol Bulletin 86:1054.
- Martin S.J., Clark R.E.** (2007) *The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems.* Cellular and Molecular Life Sciences 1-31.
- Meiri N., Rosenblum K.** (1998) *Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task.* Brain Research 789:48-55.
- Morris R.G.M., Inglis J., Ainge J.A., Olverman H.J., Tulloch, Dudai Y., Kelly P.A.T.** (2006) *Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval.* Neuron 50:479-489.
- Nader K., Schafe G.E., Le Doux J.E.** (2000) *Fear memories require protein síntesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval.* Nature 406:722-726.
- Paxinos G., Watson C.** (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Editorial Academic Press, E.E.U.U.A.

- Pedreira M.E., Maldonado H.** (2003) *Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration.* Neuron 38:863-869.
- Przybylski J., Sara S.J.** (1997) *Reconsolidation of Memory after its reactivation.* Behavioural Brain Research 84:241-246.
- Quevedo J., Vianna M.R.M., Roesler R., de-Paris F., Izquierdo I., Rose R.P.R.** (1999) *Two Time Windows of Anisomycin-Induced Amnesia for Inhibitory Avoidance Training in Rats: Protection for Amnesia by Pretraining but not Pre-exposure to the Task Apparatus.* Learning and Memory 6:600-607.
- Ramírez-Amaya V., Escobar M.L., Chao V., Bermúdez-Rattoni F.** (1999) *Synaptogenesis of Mossy Fibers Induced by Spatial Water Maze Overtraining.* Hippocampus 9:631-636.
- Ramirez-Amaya V., Balderas I., Sandoval J., Escobar M.L., Bermúdez-Rattoni F.** (2000) *Spatial Long-Term Memory is Related to Mossy Fiber Synaptogenesis.* The Journal of Neuroscience 21(18):7340-7348.
- 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.* Learning and Memory 12:533-537.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., Cammarota, M.** (2006) *Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory.* Learning & Memory 13:431-440.
- Suzuki A., Josselyn S., Frankland P., Masushige S., Silva A., Kida S.** (2004) *Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures.* The Journal of Neuroscience 24:4787-4795.
- Taubenfeld S.M., Milekic M.H., Montil B., Alberini C.M.** (2001) *The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP.* Nature 4:813-818.
- Tronson N.C., Taylor J.R.** (2007) *Molecular mechanisms of memory reconsolidation.* Nature 8:262-275.