

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



T E S I S

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS SOBRE LA
MEMORIA DE LARGO PLAZO EN UN APRENDIZAJE INCREMENTADO DE
EVITACIÓN PASIVA**

**QUE PRESENTA EL
M. EN C. ARNULFO DÍAZ TRUJILLO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROBERTO AGUSTIN PRADO ALCALÁ

JURIQUILLA, QRO. 2009



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.

A mi esposa Jessica y a mi pequeño hijo León Eduardo.

A mis padres Arnulfo y Enma Concepción.

AGRADECIMIENTOS

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

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

A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por su colaboración en los experimentos conductuales, en la medición de la inhibición de la síntesis de proteínas, por su ayuda en la realización de numerosos trámites, así como por su amistad y apoyo moral.

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría y al Dr., Federico Bermúdez Rattoni, por su asesoría como parte de mi comité tutorial durante el doctorado.

Al Dr. Victor Ramírez Amaya por las múltiples discusiones en torno a los sustratos de la memoria, así como por su asesoría como miembro interino del comité tutorial.

A los integrantes de mi jurado de examen por sus valiosas contribuciones al presente escrito, al Dr. Manuel Salas Alvarado, Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez, Dra. Sara Cruz Morales, y Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda.

A los demás compañeros integrantes del laboratorio, especialmente a Cesar Quiroz por las interesantes discusiones sobre la memoria, al Sr. Ángel Méndez Olalde por su apoyo en el cuidado de los animales y la limpieza del material, y a la M.V.Z. Norma Serafín López por su ayuda en la compra de material del laboratorio.

A los integrantes de la unidad de proteogenómica, en especial a la Dra. Anaid Antaramián Salas por su asesoría en el marcaje de proteínas con metionina 35S y a la M.C. Adriana González Gallardo por su apoyo en la obtención de reactivos y material.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por sus indispensables consejos y apoyo técnico en los métodos de marcaje radiactivo de proteínas.

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

A la M.C. Ma. del Pilar Galarza Barrios y el personal de la biblioteca por su apoyo en la obtención de material bibliográfico.

A la Lic. Ma. De Lourdes Lara Ayala de la unidad de videoconferencias, por proporcionar el servicio de videoconferencia en múltiples exámenes y evaluaciones durante el transcurso del doctorado.

A la M.C. Leonor Casanova Rico, Yolanda Orduña y Ma. del Carmen Vázquez Rodríguez por su oportuno apoyo en todos los trámites realizados.

Al personal de la Unidad de Posgrado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Zenaida Martínez, Angélica Téllez y Lorena Olivares por su apoyo en los trámites de la estancia de investigación y de titulación.

Al CONACYT y a la DGEP por las becas que me otorgaron y que hicieron posible la realización de este grado.

Finalmente a toda mi familia por su indispensable apoyo para la realización de este posgrado, sin lo cual no hubiera sido posible.

Especialmente a mi esposa Jessica por su apoyo incondicional y motivación brindada.

CONTENIDO

1. RESÚMENES.	
1.1 RESUMEN.....	2
1.2. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. ANTECEDENTES	
3.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	5
3.2 EVIDENCIA DEL REQUERIMIENTO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS PARA LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO.....	6
3.3 EVIDENCIA EN CONTRA DEL REQUERIMIENTO DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS PARA LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO.	
3.3.1 EFECTOS INESPECÍFICOS DE LOS INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	7
3.3.2 REVERSIBILIDAD DE LA AMNESIA PRODUCIDA POR INHIBIDORES DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	9
3.3.3 EFECTO PROTECTOR DEL APRENDIZAJE INCREMENTADO EN LA TAREA DE EVITACIÓN PASIVA.....	10
4. JUSTIFICACIÓN.....	12
5. HIPÓTESIS.....	12
6. OBJETIVO.....	12
7. MATERIAL Y MÉTODO.	
7.1 ANIMALES.....	13
7.2 APARATOS.....	13
7.3 ENTRENAMIENTO Y PRUEBA.....	13
7.4 TRATAMIENTOS	
7.4.1 TRATAMIENTOS POST-ENTRENAMIENTO SOBRE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO.....	14
7.4.2. TRATAMIENTOS INMEDIATAMENTE ANTES DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO....	14
7.4.3 TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS 30 MINUTOS ANTES DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA MEMORIA DE LARGO PLAZO....	15
7.4.4 TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS 30 MINUTOS ANTES DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA MEMORIA DE CORTO PLAZO.....	16
7.4.5 TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS 30 MINUTOS ANTES DEL ENTRENAMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD MOTORA	16
7.4.6 TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS 30 MINUTOS ANTES DEL ENTRENAMIENTO Y DEPENDENCIA DE ESTADO.....	16
7.5 MEDICIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	17
7.6 ESTADÍSTICA.....	18
8. RESULTADOS.....	18
9. DISCUSIÓN.....	25
10. CONCLUSIÓN.....	30
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
12. APÉNDICE A. ABREVIATURAS.....	43
13. APÉNDICE B. PUBLICACIÓN.....	44

1. RESÚMENES

1.1 Resumen

El bloqueo reversible de los receptores a neurotransmisores o la interferencia temporal con la actividad neural de varias estructuras cerebrales produce deficiencias de memoria. Sin embargo, cuando los animales son sobreentrenados, tales tratamientos se vuelven inocuos. Es bien conocido que el bloqueo de la síntesis de proteínas produce deficiencias de la memoria de largo plazo, pero no de la memoria de corto plazo, lo cual se ha tomado como evidencia de que la síntesis de proteínas se requiere para la consolidación de la memoria, aunque poco se sabe sobre el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en la memoria de aprendizajes incrementados. Para analizar con más detalle el efecto del aprendizaje incrementado contra tratamientos amnésicos, se entrenaron grupos de ratas Wistar en la tarea de evitación pasiva, usando diferentes intensidades de choque eléctrico durante el entrenamiento. Treinta minutos, inmediatamente antes o inmediatamente después del entrenamiento se inyectó cicloheximida (2.8 mg/kg, sc). Veinticuatro horas después del entrenamiento, se midieron las latencias de retención. Los hallazgos obtenidos muestran que la administración pre o post-entrenamiento de cicloheximida produjo amnesia en aquellos grupos que fueron entrenados con una intensidad de choque eléctrico relativamente baja, pero no hubo deficiencias en la consolidación cuando se entrenó a los animales con una intensidad de choque relativamente alta (sobrerreforzamiento). Estos resultados y otros similares permiten concluir que el requerimiento de síntesis de proteínas para la consolidación de la memoria no puede darse por hecho, ya que bajo determinadas condiciones podría no ser necesaria. Falta determinar si realmente la síntesis de proteínas no es necesaria para la consolidación en condiciones de sobrerreforzamiento o si la síntesis de proteínas remanente es suficiente para consolidar la experiencia.

1.2 Abstract

The reversible blockade of neurotransmission or interference with activity of numerous cerebral structures produces memory deficiencies; in many instances, however, when animals are overtrained such treatments become innocuous. Systemic administration of protein synthesis inhibitors impairs long-term retention; this effect has been interpreted to mean that protein synthesis is required for memory consolidation, though little is known about the effect of protein synthesis inhibitors on memory of enhanced learning in the rat. To further analyze the protective effect of enhanced learning against amnesic treatments, groups of Wistar rats were trained in a one-trial step-through inhibitory avoidance task, using different intensities of foot-shock during training. Cycloheximide (CHX; 2.8 mg/kg, sc), an inhibitor of protein synthesis, was injected 30 min before training, immediately before training, or immediately after training. Retention latencies were recorded twenty-four hours after training. The data obtained showed that both pre- and post-training administration of CHX produced amnesia in those groups that had been trained with relatively low foot-shock intensities, but no impairment in retention was observed when relatively high intensities of foot-shock were administered. These and similar results lead us to conclude that protein synthesis inhibitors may interfere with memory consolidation, but their effect disappears when animals are submitted to an enhanced learning experience, calling into question the idea that protein synthesis is required for memory consolidation.

2. INTRODUCCIÓN

A lo largo del proceso evolutivo, los organismos del reino animal han desarrollado mecanismos funcionales que permiten el mantenimiento adecuado de la homeostasis, y han mejorado tanto las capacidades para detectar las fuentes que suministran nutrimentos, como a los depredadores de los que tienen que huir. Estos organismos poseen una capacidad reproductiva eficaz que permite la conservación de las especies. Además de contar con esta capacidad, en gran parte de los individuos del reino animal hubo dos avances evolutivos importantes que les ha ayudado a adaptarse mejor a su medio: el aprendizaje y la memoria.

La ubicación de la memoria (el almacén de información derivada de la experiencia) en el cerebro, y los mecanismos mediante los cuales esta ocurre, han sido temas muy discutidos a lo largo de los siglos (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998). Está documentado ampliamente que las lesiones en algunas partes del cerebro provocan dificultades en el aprendizaje y la memoria. El hecho de que lesiones en ciertas áreas del cerebro provoquen efectos amnésicos (pérdida de la memoria) hace pensar que la memoria tiene su localización en ciertas estructuras cerebrales, o que su formación depende de interconexiones entre éstas (Bermúdez-Rattoni, 1998). Del mismo modo, los efectos amnésicos producidos por algunas drogas, hacen pensar que de algún modo éstas interfieren con los mecanismos de almacenamiento, y por ende tienen un sustrato bioquímico.

El conocimiento de las funciones mentales del ser humano se ha basado principalmente en el estudio de las patologías que alteran los procesos cognitivos. Sin embargo, este tipo de estudio habitualmente no nos permite hacer manipulaciones experimentales con las que se puedan establecer claramente interrelaciones (causa-efecto) entre estructuras cerebrales, eventos fisiológicos y funciones mentales. Una alternativa para el estudio experimental de las bases biológicas de dichas funciones es el uso de modelos en animales (Prado-Alcalá y Quirarte, 1993). Esto permite la exploración de eventos bioquímicos asociados con el almacenamiento de la memoria mediante la administración sistémica o local de drogas, entre otras técnicas (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998). Uno de los mecanismos bioquímicos que parece participar en la formación de la memoria de largo plazo es la síntesis de proteínas cerebrales. Si la síntesis de proteínas es indispensable para

el almacenamiento de la memoria de largo plazo, entonces la inhibición de dicha síntesis deberá irremediablemente producir amnesia una vez que la información mantenida en la memoria de corto plazo decae. En nuestro laboratorio se ha encontrado que bajo condiciones de entrenamiento aumentado, el tratamiento con fármacos que usualmente son amnésicos dejan de serlo. En este trabajo se propone determinar si esto ocurre también con la inhibición de síntesis de proteínas.

el almacenamiento de la memoria de largo plazo, entonces la inhibición de dicha síntesis deberá irremediablemente producir amnesia una vez que la información mantenida en la memoria de corto plazo decae. En nuestro laboratorio se ha encontrado que bajo condiciones de entrenamiento aumentado, el tratamiento con fármacos que usualmente son amnésicos dejan de serlo. En este trabajo se propone determinar si esto ocurre también con la inhibición de síntesis de proteínas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Aprendizaje y memoria

Aunque existen múltiples conceptos sobre el aprendizaje, la mayoría de ellos coincide en que este proceso es un cambio en la conducta, relativamente permanente, que resulta de la experiencia (citado por Prado-Alcalá, 1991), lo cual implica un almacenamiento de la información derivada de las experiencias de aprendizaje, es decir, la memoria (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998). En la actualidad el trabajo de los científicos interesados en el estudio de las bases biológicas de la memoria está centrado en la búsqueda del engrama, término introducido en el campo por el biólogo alemán Richard Semon en 1904. El engrama puede ser definido como el conjunto de cambios en el sistema nervioso que representan a la memoria almacenada (Squire, 1987). Esta búsqueda ha originado dos grandes líneas de investigación, una la constituye la búsqueda de los mecanismos fisiológicos de los que depende el almacenamiento de información, y la segunda la búsqueda de las estructuras cerebrales involucradas en dicho almacenamiento; entre los mecanismos fisiológicos que subyacen al establecimiento de la memoria se encuentran: a) cambios en la cantidad de mediadores químicos en la sinapsis que participan en el proceso, y b) incremento en la síntesis de proteínas neuronales (Prado-Alcalá y Quirarte, 1998).

De acuerdo con algunos autores, la memoria puede ser dividida en al menos dos categorías generales: la memoria explícita o declarativa, que es el recuerdo consciente de conocimiento sobre personas, lugares y cosas, que está particularmente bien desarrollada en el cerebro de los vertebrados, y la memoria implícita o no declarativa, que es el recuerdo inconsciente de habilidades motoras y otras tareas e incluye formas asociativas simples como el condicionamiento clásico y formas no asociativas como la sensibilización y la habituación. Los dos tipos de memoria parecen involucrar diferentes circuitos neuronales.

La memoria explícita depende fundamentalmente de estructuras del lóbulo temporal y diencefálicas (como el hipocampo, el subículum y la corteza entorrinal) mientras la implícita no depende de la función del lóbulo temporal, sino que involucra las mismas vías motoras, sensoriales o asociativas usadas en la expresión del aprendizaje. Tanto la memoria explícita como la implícita pueden dividirse en al menos dos componentes temporales: la memoria de corto plazo (MCP) con duración de minutos a horas y la memoria de largo plazo (MLP) con duración de días, semanas y en algunas casos de por vida (ver referencias en Bermúdez-Rattoni y Prado-Alcalá, 2001).

3.2 Evidencia del requerimiento de síntesis de proteínas para la formación de la memoria de largo plazo

Katz y Halstead, en 1950, fueron probablemente los primeros en postular la hipótesis de que la síntesis de proteínas es necesaria para el almacenamiento de la memoria (Rosenzweig, 1996). A finales de la década de 1950 se descubrieron antibióticos que inhibían la síntesis de proteínas en células animales (Ennis y Lubin, 1964; Yarmolinsky y Haba, 1959). Esto permitió poner a prueba esta hipótesis. Se encontró que la administración de inhibidores de la síntesis de proteínas (ISPs) produce un deterioro en la formación de la memoria de largo plazo pero no en la memoria de corto plazo. Dicho efecto amnésico ocurre en roedores cuando se utilizan diferentes ISPs que poseen mecanismos de acción diferentes (Barondes y Cohen, 1966, 1967a; Davis, 1976; Squire y Barondes, 1973; Davis y cols., 1976), en diversas tareas de aprendizaje, incluyendo la de evitación pasiva que es la que se utilizó en el presente trabajo (Barrientos y cols., 2002; Flood y cols., 1975b; Hernández y cols., 2002; Meiri y Rosenblum, 1998; Schafe y LeDoux, 2000; Barrientos y cols., 2002). La amnesia producida por estas drogas, es dependiente de las dosis administradas y se correlaciona con el grado de inhibición de la síntesis de proteínas (Flexner y cols., 1965; Tucker y cols., 1976; Quinton y Kramarcy, 1977), aunque hay reportes de que la amnesia no se correlaciona con el grado de inhibición de la síntesis de proteínas (Rainbow y cols., 1980).

El deterioro en la memoria de largo plazo también se ha reportado en aves (Bull y cols., 1976; Freeman y cols., 1995; Gibbs y Ng, 1984; Meiri y Rosenblum, 1998; Stettner y cols., 1977), peces (Agranoff y cols., 1965), moluscos (Agin y cols., 2003; Crow y

Forrester, 1990; Ezzeddine y Glanzman, 2003; Fulton y cols., 2005; Matsuo y cols., 2002) insectos (Barraco y cols., 1981; DeZazzo y Tully, 1995; Wustenberg y cols., 1998) y lombrices (Watanabe y cols., 2005). Esta evidencia ha conducido al consenso de que al menos algunos de los mecanismos del almacenamiento de la memoria se encuentran muy conservados a lo largo de la escala filogenética, así como que la memoria de corto plazo no depende de síntesis de proteínas, mientras que la memoria de largo plazo es dependiente de la síntesis de proteínas.

3.3 Evidencia en contra del requerimiento de síntesis de proteínas para la formación de la memoria de largo plazo

3.3.1 Efectos inespecíficos de los inhibidores de la síntesis de proteínas

A pesar de la amplia evidencia que parece apoyar la teoría de que la formación de la memoria de largo plazo requiere de síntesis de proteínas, esta ha sido cuestionada por resultados provenientes de dos grupos de estudios. El primero se refiere al descubrimiento de efectos inespecíficos producidos por los ISPs, los cuales podrían ser causa importante de los efectos amnésicos de estos fármacos. Aunque los efectos inespecíficos descritos inicialmente para los ISPs no parecen contribuir a su efecto amnésico, otros de estos efectos descritos más recientemente sí parecen hacerlo. Uno de los primeros efectos inespecíficos descritos para los ISPs (puromicina, acetocicloheximida [ACX], cicloheximida [CHX], y anisomicina [ANI]) es su capacidad de inhibir la síntesis de catecolaminas y producir la acumulación de tirosina (Flexner y cols., 1973; Flexner y Goodman, 1975; Freedman y cols., 1982).

Se sabía que las catecolaminas participan de manera importante en la formación de la memoria y esto sugería que el efecto amnésico de los ISPs podría depender al menos en parte a una reducción de las pozas funcionales de catecolaminas o al aumento en los niveles de tirosina. Sin embargo, la administración de α -metil p-tirosina (AMPT) o DDC, que deprimen la síntesis de catecolaminas cerebrales en mayor grado que la CHX, no producen efecto en la memoria. De modo similar, la administración de tirosina tampoco produjo efectos en la memoria cuando se administró en una dosis que produce incrementos mayores en los niveles de tirosina que los producidos por una dosis amnésica de CHX que produce una inhibición del 90 al 95% de inhibición de síntesis de proteínas en el ratón. Estos

resultados indican que los efectos de los ISPs sobre la síntesis de catecolaminas o sobre los niveles de tirosina cerebrales no son suficientes para explicar sus efectos amnésicos (Flood y cols., 1980, 1986; Spanis y Squire, 1978; Squire y cols., 1974). Conclusiones similares se obtuvieron con las alteraciones en los niveles cerebrales de aminoácidos producidos por estos fármacos. La emulación de las alteraciones en los niveles de aminoácidos cerebrales mediante su administración exógena, no produjo efectos amnésicos (Schweri y Carr, 1982).

Resultados como los antes citados, permitieron que se desestimara a los efectos inespecíficos como la causa de la amnesia producida por los ISPs. Sin embargo, trabajos recientes muestran que otros efectos inespecíficos pueden explicar, al menos parcialmente, la amnesia producida por este tipo de fármacos. El caso con la evidencia más sólida es el reportado por Canal y sus colaboradores. Este grupo descubrió que la infusión intraamigdalina de una dosis amnésica de ANI produce un rápido incremento en la liberación de norepinefrina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) de 1000 a 17,000% por encima de los niveles basales medido en el sitio de la infusión. Este efecto inicial va seguido por un efecto más tardío en el que hay una amplia y prolongada disminución en la liberación de estos neurotransmisores. El bloqueo de los receptores β -adrenérgicos de la amígdala al momento de las inyecciones de ANI, atenúa la amnesia producida por la ANI cuando la retención del aprendizaje es medida 48 h después del entrenamiento. Del mismo modo la activación de receptores β 2-adrenérgicos durante el tiempo de la depleción de aminas, también atenúa la amnesia producida por anisomicina. La inyección pre-entrenamiento de una dosis alta de NA produce un deterioro en la memoria similar al observado con la inyección de anisomicina. Estos hallazgos sugieren que las inyecciones intraamigdalinas de ANI interfieren con la formación de la memoria mediante la inducción de grandes cambios en los perfiles de liberación de NA, DA y 5-HT (Canal y cols., 2007). Estos resultados también implican que los efectos amnésicos de la anisomicina en otras estructuras importantes para la formación de la memoria podrían estar mediados por alteraciones en la liberación de estos neurotransmisores.

Se han reportado otros efectos inespecíficos de ISPs que afectan procesos que participan en la formación de la memoria de largo plazo, aunque su papel en la amnesia producida por estos fármacos no ha sido estudiado. Estos incluyen, la capacidad de la anisomicina de inducir la activación de algunas proteínas de la vía de las MAPK, como

ERK1/2, p38, JNK, Elk-1 y la fosforilación de CREB (Bebien y cols., 2003; Hazzalin y cols., 1998; Kang y cols., 2006; Shin y cols., 2006; Zinck y cols., 1995), la expresión de genes tempranos como genes c-jun, c-fos y zif268 (Kukushkin y cols., 2005; Torocsik y Szeberenyi, 2000), e incluso, mediante la activación de las MAPK se pueden producir cambios plásticos como la LTD (Xiong y cols., 2006). La CHX por su parte es capaz de activar JNK (Barr y Bogoyevitch, 2001) y también de inducir la superexpresión de genes tempranos (Edwards y Mahadevan, 1992; Hughes y cols., 1997; Mahadevan y Edwards, 1991). Todas estas moléculas afectadas por los ISPs están implicadas en la formación de la memoria de largo plazo (Bailey y cols., 1996; Bevilaqua y cols., 2003; Bozon y cols., 2003; Cammarota y cols., 2000; Guzowski, 2002; Jones y cols., 2001; Mazzucchelli y cols., 2002). Adicionalmente, la superinducción de genes tempranos deja abierta la posibilidad planteada por Routtenberg y Rekart de que los ISPs pudieran estar ejerciendo sus efectos amnésicos a través del aumento retardado en la síntesis de algunas proteínas y no debido a la inhibición de su síntesis (Routtenberg y Rekart, 2005).

3.3.2 Reversibilidad de la amnesia producida por inhibidores de síntesis de proteínas

El otro grupo de datos que arguye contra de la teoría de que la formación de la memoria de largo plazo requiere de síntesis de proteínas, es que bajo determinadas condiciones el tratamiento con ISPs, que produce un grado de inhibición cercano o mayor al 90% por varias horas, no produce amnesia en la memoria de largo plazo (Barondes y Cohen, 1967a; Flexner y Flexner, 1966), se revierte espontáneamente (Flexner y cols., 1966; Rainbow y cols., 1980; Serota, 1971), o mediante algunas modificaciones a la tarea de aprendizaje como la administración de un mayor número de ensayos (Barondes y Cohen, 1967b; Flood y cols., 1975b; Squire y Barondes, 1972), el incremento en la intensidad del entrenamiento (Flood y cols., 1972), la exposición de una experiencia recordatoria (Quartermain y cols., 1970) o bien por la administración de una amplia variedad de fármacos excitatorios, los cuales en los casos en los que se ha determinado, no afectan ni el grado ni la duración de la inhibición producida por los ISPs (Flood y cols., 1977; Hall y cols., 1976; Martinez y cols., 1981; Quartermain y cols., 1977).

Entre la larga lista de los fármacos que pueden revertir la amnesia producida por ISPs se encuentran los agonistas α -adrenérgicos metaramirol, metoxamina y clonidina, el β -adrenérgico isoproterenol, cuando se administran por vía sistémica. Este efecto puede a su

vez ser bloqueado por antagonistas α y β adrenérgicos (piperoxano y propanolol). Otros fármacos que incrementan la neurotransmisión adrenérgica, como el antidepresivo tricíclico imipramina y la d-anfetamina o los inhibidores de la aminoxidasa, también revierten la amnesia. La estimulación de otros receptores dopaminérgicos con pirebedil y los colinérgicos con pilocarpina es inefectiva para revertir la amnesia cuando la administración es por vía sistémica (Botwinick y Quartermain, 1974; Gibbs, 1976; Quartermain y cols., 1977; Roberts y cols., 1970; Serota y cols., 1972). Sin embargo en un reporte del Altman y Quartermain, en 1983, se muestra que la administración intracerebroventricular de d-anfetamina, dopamina, o del agonista dopaminérgico lisurida aminoran la amnesia producida por la anisomicina sistémica, pero no así la administración de norepinefrina o del agonista adrenérgico clonitidina (Altman y Quartermain, 1983).

Otros fármacos con efectos antiamnésicos contra los ISPs son los estimulantes cafeína, nicotina, estricnina, pentilentetrazol y el antagonista gabaérgico picrotoxina (Flood y cols., 1978a; Hall y cols., 1976; Sershen y cols., 1982). También el inhibidor de la recaptura de serotonina fluoxetina (Flood y Cherkin, 1987), la lisina-vasopresina (Judge y Quartermain, 1982), los inhibidores de la acetilcolinesterasa T-82 y tacrina cuando se administran de forma crónica (Isomae y cols., 2003; Nabeshima y cols., 1991), el antagonista de los receptores a opiodes naloxona (Flood y cols., 1987; Kameyama y cols., 1986), el inhibidor de las fosfodiesterasas rolipram (Imanishi y cols., 1997), el péptido ceruleina (Itoh y cols., 1992), un extracto purificado de péptidos de la pituitaria (Flexner y Flexner, 1971), así como varios péptidos hipofisarios, entre los que se encuentran un fragmento de la hormona adrenocorticotrópica ACTH 4-10-L-Phe-7 (Flood y cols., 1976), algunas variantes y análogos de vasopresina, oxitocina y Z-MIF (Flexner y cols., 1977), el análogo de la hormona liberadora de tirotropinas NS-3, así como los corticosteroides corticosterona y dexametasona (Day y cols., 1977; Flood y cols., 1978b; Nakajima, 1975; Sandi y Rose, 1994).

3.3.3 Efecto protector del aprendizaje incrementado en la tarea de evitación pasiva.

Durante mucho tiempo, en nuestro laboratorio hemos estado interesados en el efecto protector del entrenamiento incrementado contra tratamientos que normalmente son amnésicos. Hemos encontrado que existe un efecto protector producido por el

entrenamiento aumentado en la tarea de evitación pasiva, contra los efectos de dosis amnésicas de escopolamina sistémica (Cruz-Morales y cols., 1992; Duran-Arevalo y cols., 1990) o de p-cloroanfetamina (Solana-Figueroa y cols., 2002). El efecto protector del entrenamiento incrementado en esta tarea también ocurre con fármacos que usualmente son amnésicos cuando son administrados en el hipocampo (Quiroz y cols., 2003), sustancia nigra (Cobos-Zapiaín y cols., 1996) y el estriado (Díaz del Guante y cols., 1990; Durán-Arévalo y cols., 1990; Giordano y Prado-Alcalá, 1986; Pérez-Ruiz y Prado-Alcalá, 1989; Prado-Alcalá y cols., 1980). En ratones se ha reportado que en la tarea de evitación pasiva, el efecto amnésico producido por la administración de ISPs administrado 15 minutos antes del entrenamiento se reduce cuando se aumenta la intensidad de la estimulación aversiva (Flood y cols., 1972; Flood y cols., 1973; Quartermain y McEwen, 1970). Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio en la rata con la administración del inhibidor de síntesis de proteínas inmediatamente después del entrenamiento incrementado. En el presente estudio se tiene el propósito de determinar si el entrenamiento incrementado también ejerce un efecto protector contra la amnesia producida por la inhibición de la síntesis de proteínas pre o post entrenamiento.

4. JUSTIFICACIÓN

Se considera que la síntesis de proteínas es un requisito indispensable para la formación de la memoria de largo plazo. Sin embargo, existen antecedentes que permiten contemplar la posibilidad de que el entrenamiento incrementado pueda producir un efecto protector contra la amnesia producida por la inhibición de la síntesis de proteínas.

5. HIPÓTESIS

El entrenamiento incrementado de las ratas en una tarea de aprendizaje de evitación pasiva producirá un efecto protector contra la amnesia producida por la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas.

6. OBJETIVO

Determinar si el entrenamiento incrementado en una tarea de aprendizaje de evitación pasiva produce un efecto protector contra la amnesia producida por la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas.

7. MATERIAL Y MÉTODO

El protocolo experimental descrito a continuación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

7.1 Animales

Los animales fueron ratas macho de la cepa Wistar (250-350g), mantenidas en un bioterio con un ciclo luz oscuridad 12 hr/12 hr (con la luz iniciando a las 7:00 h), en cajas individuales de acrílico con comida y agua *ad libitum*. La temperatura se mantuvo constante a 22°C en los cuartos en los cuales los animales fueron manipulados y mantenidos. Los sujetos permanecieron en estas condiciones por lo menos 5 días antes de que los experimentos iniciaran. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a los diferentes grupos estudiados.

7.2 Aparatos

El entrenamiento y la prueba fueron realizados en un aparato específicamente diseñado para estudiar el aprendizaje de evitación pasiva de un sólo ensayo. El aparato es una cámara con dos compartimentos, separada por una puerta tipo guillotina. Uno de los compartimentos tiene paredes y tapa de acrílico color rojo con un piso de tubos de acero inoxidable (6 mm de diámetro, separados por 9 mm). El compartimento de inicio estuvo iluminado por un foco incandescente de 10 W localizado en el centro de su tapa. El otro compartimento no iluminado tiene paredes de acero inoxidable que forman una “V” hacia el centro del piso, entre las cuales hay 1.5 cm de separación, mismas que pueden ser electrificadas por encontrarse conectadas a un estimulador que genera pulsos cuadrados, conectado a una unidad de corriente constante. La cámara de condicionamiento estuvo localizada en un cuarto sonoamortiguado y oscuro provisto de una fuente de ruido de fondo.

7.3 Entrenamiento y prueba

El día del entrenamiento cada animal fue colocado dentro del compartimento iluminado; 10 s después la puerta entre los dos compartimentos se abrió, y se midió la latencia para cruzar al otro compartimento (latencia de entrada). Cuando los animales cruzaron a este compartimento la puerta fue cerrada y se administró un choque eléctrico; las intensidades

del estímulo serán especificadas más adelante. Cinco segundos después la puerta fue reabierto permitiendo al animal escapar al compartimiento de inicio apagándose el estimulador. La latencia también se midió, como latencia de escape. Después de 30 s en el compartimiento de inicio, el animal fue devuelto a su caja hogar. Durante la prueba de retención, se siguió el mismo procedimiento excepto que no se administró choque eléctrico. Si el animal no cruzó al segundo compartimiento en 600 s, la sesión se dio por terminada y se le designó una latencia de retención de 600 s.

7.4 Tratamientos

7.4.1 Tratamientos post-entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

Durante el entrenamiento se usaron 4 intensidades de choque: 0.6, 0.8, 1.0 y 2.0 mA. Para cada intensidad hubieron 2 grupos de ratas: inyectadas con vehículo, o inyectadas con 2.8 mg/kg de CHX (Sigma-Aldrich St. Louis USA). La dosis elegida, se sabe que deteriora la consolidación de la memoria en ratas (Milekic y cols., 2006; Squire y cols., 1980). Se administró el vehículo o CHX por vía subcutánea en un volumen de aproximadamente 0.25 ml, inmediatamente después del entrenamiento de evitación pasiva. La CHX fue disuelta en dimetil sulfóxido (DMSO) y finalmente diluida a 1% de DMSO en solución salina isotónica. La solución del vehículo se preparó de manera similar. La prueba de retención se realizó 24 h después del entrenamiento (Ver esquema 1).

7.4.2. Tratamientos inmediatamente antes del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

Durante la administración post-entrenamiento de CHX hay una ventana temporal entre la inyección y el establecimiento de la inhibición de la síntesis de proteínas. Esto deja abierta la posibilidad de que el entrenamiento con los niveles más altos de choque eléctrico produzca un aceleramiento de la consolidación de la memoria. Para explorar esta posibilidad se usaron cuatro intensidades de choque eléctrico: 0.6, 0.8, 2.4 y 3.2 mA. Para cada intensidad se inyectó con vehículo o CHX subcutáneamente inmediatamente antes del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva. La prueba de retención se realizó 24 h después del entrenamiento (Ver esquema 1).



Tratamientos

- Veh o CHX inmediatamente post-entrenamiento en la MLP (0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mA)
- Veh o CHX inmediatamente pre-entrenamiento en la MLP (0.6, 0.8, 2.4, 3.2 mA)
- Veh o CHX 30 minutos pre-entrenamiento en la MLP (0.8, 2.4, 3.2 mA)

↓ Las flechas indican el momento de inyección del tratamiento

Esquema 1. Tratamientos sobre la memoria de largo plazo (MLP)

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

La inhibición de la síntesis de proteínas requiere 30 minutos para alcanzar su máximo nivel después de la inyección subcutánea de CHX, de acuerdo a nuestras mediciones (ver sección 7.5). Esta ventana temporal entre la inyección inmediatamente antes del entrenamiento y el establecimiento de la inhibición de la síntesis de proteínas sigue dejando abierta la posibilidad de que el entrenamiento con los niveles más altos de choque eléctrico produzca un aceleramiento de la consolidación de la memoria. Para explorar esta posibilidad se usaron tres intensidades de choque eléctrico: 0.8, 2.4 y 3.2 mA. Para cada intensidad se inyectó con vehículo o CHX subcutáneamente 30 minutos antes del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva. La prueba de retención se realizó 24 h después del entrenamiento (Ver esquema 1).

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

Para determinar si los efectos de la CHX inyectada antes del entrenamiento se ejercen sobre la consolidación de la memoria o sobre el aprendizaje, se inyectaron grupos de ratas independientes con CHX o vehículo subcutáneo y treinta minutos después fueron entrenadas con 0.8mA en la tarea de evitación pasiva. Se midió la retención 30 minutos después del entrenamiento (MCP). Deterioros de la MCP sugerirían un deterioro en el aprendizaje. La ausencia de deterioros en la MCP sugeriría que las deficiencias en la retención a las 24 hr (MLP) se explican mejor como una interferencia con la consolidación de la memoria (ver esquema 2).

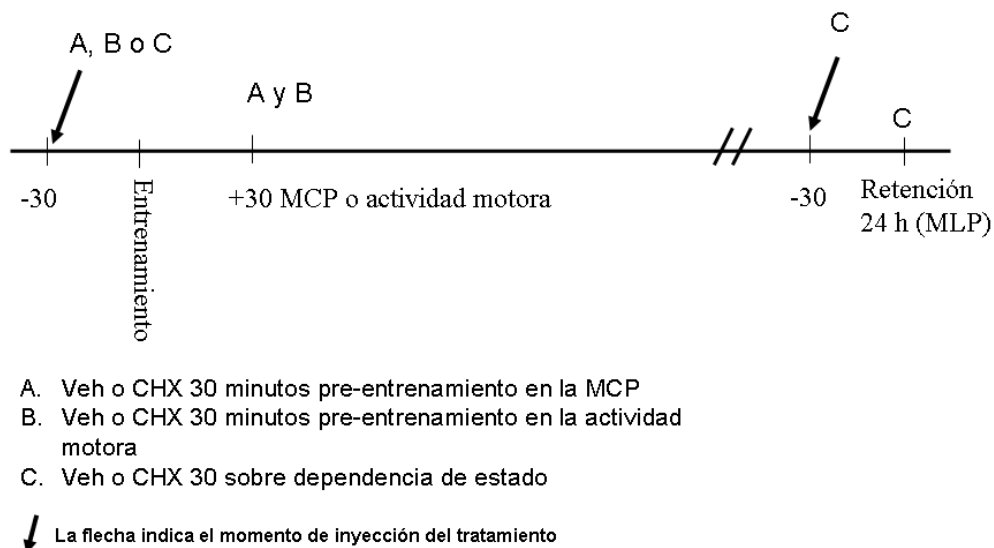
7.4.5 Tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento sobre actividad motora

Dado que en la retención a los 30 min los animales aún se encuentran bajo influencia de la droga, es necesario determinar si ésta produce problemas motores que pudieran interferir con la ejecución de la sesión de prueba. Para descartar esta posibilidad se realizó el mismo experimento aquí descrito, pero no se administró choque eléctrico alguno. La ausencia de diferencias entre los grupos tratados con vehículo o con CHX en la latencia de entrada y en la latencia de retención a los 30 min sugeriría que los efectos motores producidos por la droga, si los hubiese, no interfieren con la medición de la memoria de la tarea (ver esquema 2).

7.4.6 Tratamientos administrados 30 minutos antes del entrenamiento y dependencia de estado

Debido a que en el tratamiento pre-entrenamiento, los animales están bajo el efecto de la droga durante el aprendizaje, podría ocurrir una dependencia de estado, una forma peculiar de aprendizaje en la que la información que ha sido aprendida mientras el animal se encuentra bajo la influencia de una cierta droga (estado) puede ser recordada y usada para resolver una tarea solo cuando el animal se encuentra en el mismo estado en el cual la información fue aprendida, pero no en un estado diferente, por ejemplo cuando no está bajo la influencia del fármaco. Para determinar si este es el caso, se entrenaron dos grupos

independientes de ratas en la tarea de evitación inhibitoria (EI) con 0.8 mA. Se inyectó vehículo o CHX 30 minutos antes del entrenamiento y 30 minutos antes de la prueba de retención a las 24 h (ver esquema 2).



Esquema 2. Tratamientos sobre la memoria de corto plazo (MCP), actividad motora y dependencia de estado. El entrenamiento se realizó con 0.8mA

7.5 Medición de la inhibición de la síntesis de proteínas

Grupos de ratas ($n = 4$) fueron inyectados con vehículo o CHX y se sacrificaron 15 min, 30 o 60 después de la inyección. Quince minutos antes del sacrificio, todas las ratas se inyectaron por vía intraperitoneal con 125 μ Ci de L-[³⁵S] metionina. Adicionalmente, para determinar si el entrenamiento en la tarea de evitación pasiva bajo condiciones de sobrerreforzamiento (2.0 mA) reduce la efectividad de la inhibición de síntesis de proteínas, se entrenaron más ratas en esta tarea bajo las mismas condiciones e inmediatamente después fueron inyectadas con vehículo o CHX. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después.

Después del sacrificio, los cerebros completos fueron homogenizados en buffer de lisis frío (1% SDS, 60 mM Tris-Cl, pH 7.4, 62.4 mM imidazol, 40 mM DTT, 10% glicerol)

y hervidos por 5 min. Un mililitro de cada homogenado se mezcló de manera vigorosa con 1 ml de ácido tricloroacético al 20% para precipitar las proteínas. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g por 4 min a temperatura ambiente. El precipitado fue resuspendido en líquido de centelleo. La proteína fue cuantificada a partir del homogenado por el método de Bradford. La inhibición de la síntesis de proteína fue calculada con la siguiente fórmula: $[1 - (\text{CPM en 1mg de proteína muestra con CHX} / \text{CPM en 1 mg de proteína muestra con vehículo})] \times 100$.

7.6 Estadística

Debido al punto de corte arbitrario (600 s), los datos derivados de las pruebas de retención no se distribuyeron de forma normal. Por esta razón se utilizó estadística no paramétrica. Se realizaron análisis independientes para las latencias de adquisición, escape y retención, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando fue apropiado, se usó la prueba U de Mann-Whitney para comparar la ejecución entre pares de grupos.

8. RESULTADOS

8.1 Tratamientos post-entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

No hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento y escape entre los grupos experimentales y controles para las cuatro intensidades de choque eléctrico con post-entrenamiento. Cuando el entrenamiento se realizó con las intensidades de choque más bajas (0.6, 0.8 y 1.0 mA), la administración post-entrenamiento de CHX produjo una deficiencia significativa en la retención en comparación con el grupo de vehículo ($p=0.01$, 0.02 y 0.05 respectivamente). Sin embargo, la administración de CHX en el grupo que fue entrenado con 2.0mA no causó deterioro en la retención (Fig. 1).

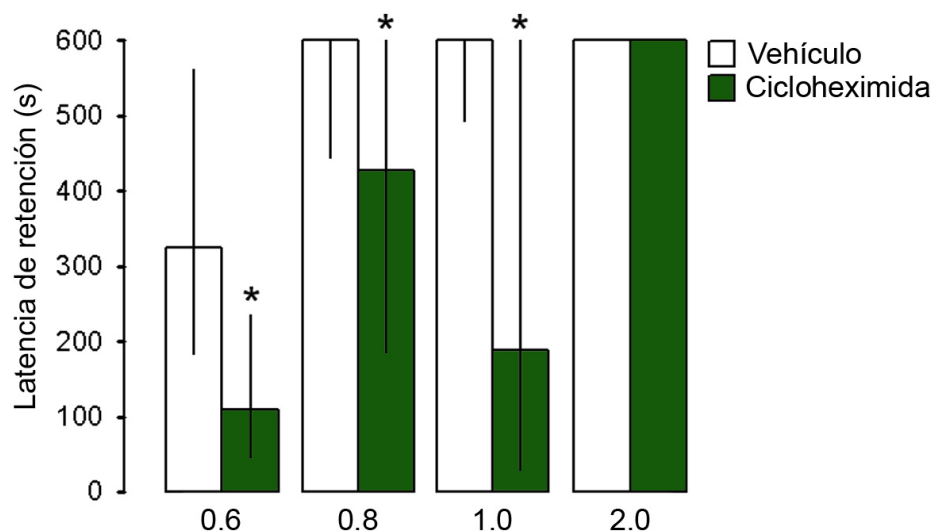


Figura. 1. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva de las ratas que recibieron inyecciones subcutáneas (sc) de vehículo o 2.8 mg/kg de cicloheximida (CHX) y entrenadas con 0.6, 0.8, 1.0 ó 2.0 mA. Las inyecciones fueron administradas inmediatamente después del entrenamiento. *, $p < 0.05$.

8.2 Tratamientos inmediatamente antes del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

Con los tratamientos administrados inmediatamente antes del entrenamiento, no hubo diferencias significativas en las latencias de entrenamiento y de escape entre los grupos experimentales y controles para las cuatro intensidades de choque. En la retención a las 24 h, los grupos tratados con CHX y entrenados con 0.8 ó 2.4 mA muestran deterioro ($p = 0.05$ y 0.01 , respectivamente). Sin embargo, cuando las ratas fueron entrenadas con 3.2 mA no se observan deficiencias significativas en el grupo de CHX en comparación con el grupo de vehículo. En las ratas entrenadas con 0.6mA no hay diferencias entre las latencias de retención entre los tratamientos, pero las latencias de retención no difieren de las latencias de entrenamiento (Fig. 2).

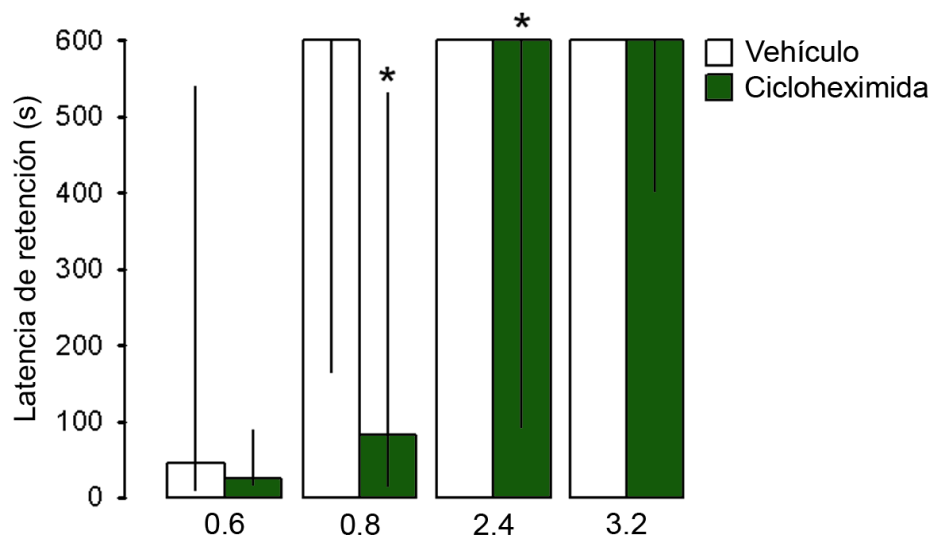


Figura. 2. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva de las ratas que recibieron inyecciones sc de vehículo o 2.8 mg/kg de CHX y entrenadas con 0.6, 0.8, 2.4 ó 3.2 mA. Las inyecciones fueron administradas inmediatamente antes del entrenamiento. *, $p < 0.05$.

8.3 Tratamientos aplicados 30 minutos antes del entrenamiento sobre la memoria de largo plazo

Con los tratamientos 30 min antes del entrenamiento, no se encontraron diferencias en las latencias de entrenamiento entre los grupos experimental y control para las tres intensidades de choque. Sin embargo, en las latencias de escape, se encontró una diferencia significativa entre el grupo experimental y el grupo control cuando la intensidad fue de 3.2 mA ($p=0.031$). Siendo la latencia del grupo tratado con CHX la más corta. Aunque este grupo no fue significativamente diferente de los otros grupos de CHX entrenados con las otras intensidades. En la retención a las 24 h se encontró un deterioro significativo en el grupo tratado con CHX y entrenado con 0.8 mA ($p = 0.011$). Sin embargo, cuando las ratas fueron entrenadas con 2.4 ó 3.2 mA, no hubo deficiencias en los grupos tratados con CHX en comparación con los grupos de vehículo (Fig. 3).

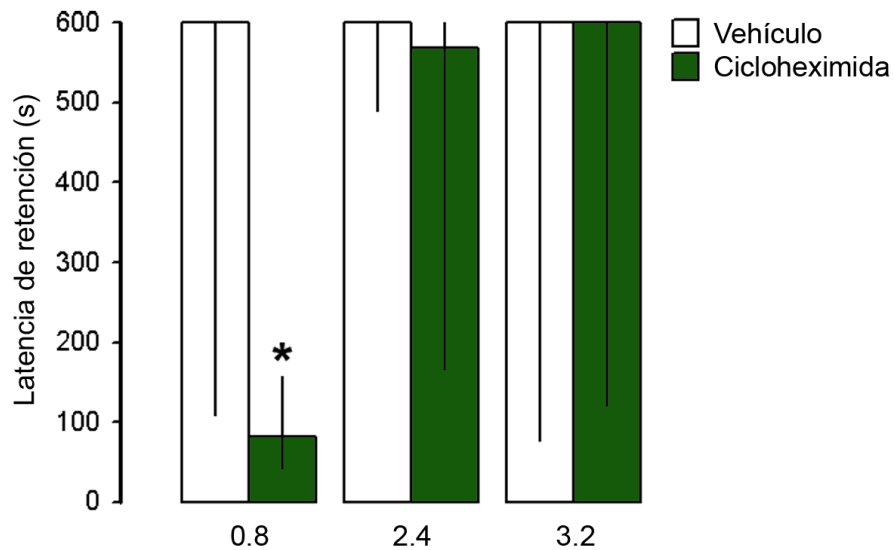


Figura. 3. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva de las ratas que recibieron inyecciones sc de vehículo o 2.8 mg/kg de CHX y entrenadas con 0.8, 2.4 ó 3.2 mA. Las inyecciones fueron administradas 30 minutos antes del entrenamiento. *, $p < 0.05$.

8.4 Memoria de corto plazo y control motor

No se encontró deterioro significativo en la memoria de corto plazo por CHX (Fig. 4). Este efecto no puede ser explicado por deterioros motores, debido a que el mismo procedimiento experimental, pero sin el choque no produce diferencias en las latencias de entrenamiento y retención entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con CHX (Fig. 5).

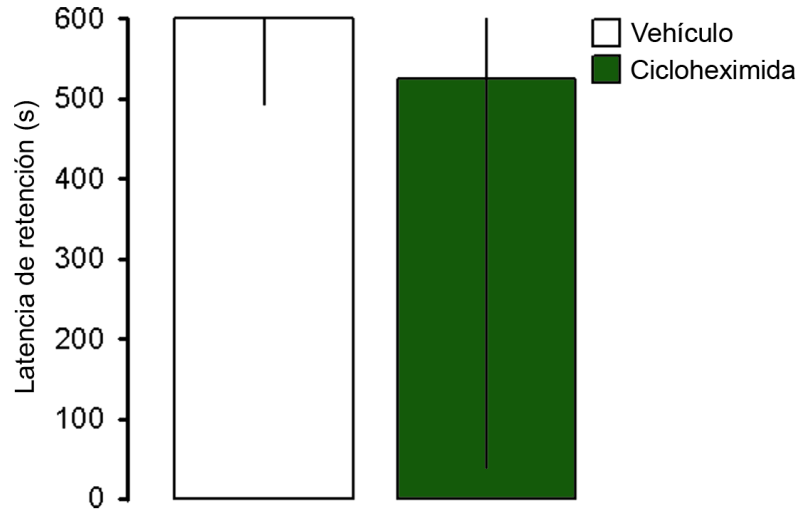


Figura. 4. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas 30 minutos después del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva de las ratas que recibieron inyecciones sc de vehículo o 2.8 mg/kg de CHX y entrenadas con 0.8 mA. Las inyecciones fueron administradas 30 minutos antes del entrenamiento. *, $p < 0.05$.

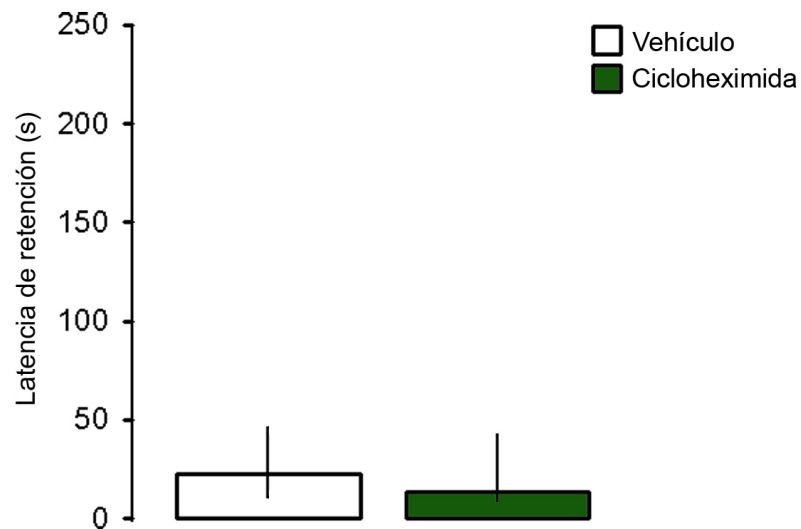


Figura. 5. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas 30 minutos después de un falso entrenamiento en la tarea de evitación pasiva de las ratas que recibieron inyecciones sc de vehículo o 2.8 mg/kg de CHX y entrenadas sin choque. Las inyecciones fueron administradas 30 minutos antes del entrenamiento. *, $p < 0.05$.

8.5 Dependencia de estado

No se encontró dependencia de estado, es decir la forma de aprendizaje en la que la información que ha sido aprendida mientras el animal se encuentra bajo la influencia de una cierta droga (estado) puede ser recordada solo cuando el animal se encuentra en el mismo estado en el cual la información fue aprendida. La administración de CHX antes de ambas sesiones, 30 minutos antes del entrenamiento y de la prueba retención no revierte el deterioro en la retención de la memoria causados por la administración de CHX 30 minutos antes del entrenamiento ($p=0.081$) (Fig. 6)

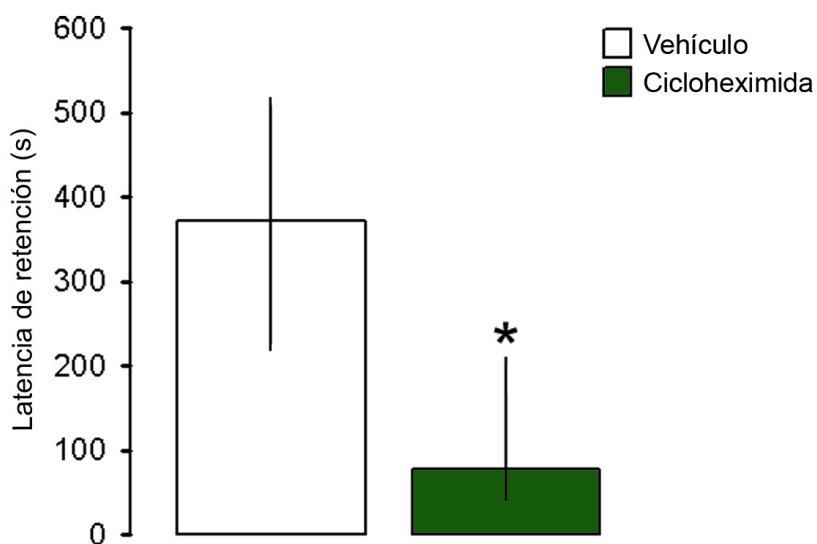


Figura. 6. Mediana y rangos intercuartiles de las latencias de retención obtenidas 24 horas después del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva de las ratas que recibieron inyecciones sc de vehículo o 2.8 mg/kg de CHX y entrenadas con 0.8 mA. Las inyecciones fueron administradas 30 minutos antes del entrenamiento y 30 minutos antes de la prueba de retención en cada grupo. *, $p < 0.05$.

8.6 Medición de la inhibición de la síntesis de proteínas

El grado de inhibición de la síntesis de proteínas fue 58, 68 y 64% a los 15, 30 y 60 min respectivamente. En el grupo entrenado en la tarea de evitación pasiva, la inhibición de la síntesis de proteínas a los 30 min fue del 64% (Fig. 7).

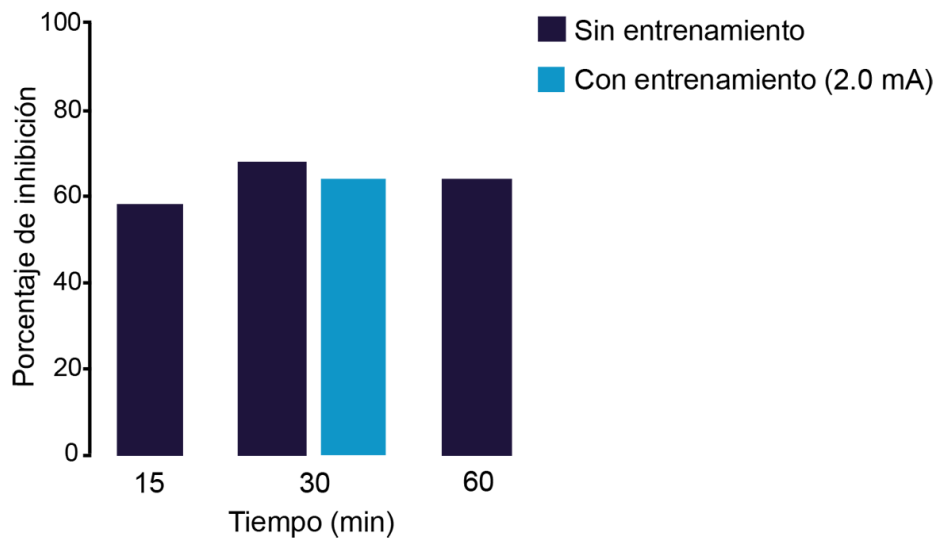


Figura. 7. Inhibición de la síntesis de proteínas en ratas inyectadas con 2.8 mg/kg de CHX en relación a ratas inyectadas con vehículo. A varios tiempos con respecto al momento de la inyección del tratamiento. En animales no entrenados, o entrenados en la tarea de evitación pasiva con 2.0 mA.

9. DISCUSIÓN

Los resultados aquí presentes muestran que la administración de CHX antes o después del entrenamiento en una tarea de evitación pasiva produce un marcado deterioro de la memoria cuando se realiza con choques de intensidad relativamente baja, pero que dicho efecto amnésico no ocurre cuando se aumenta la intensidad del choque dado durante el entrenamiento. Estudios previos habían mostrado que la administración de dosis amnésicas de ISPs antes del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva no produce amnesia cuando los animales son entrenados con intensidades de choque relativamente altas (Flood y cols., 1972; Flood y cols., 1973). Sin embargo, generalmente en los estudios de aprendizaje y memoria los tratamientos pre-entrenamiento no permiten interpretaciones claras de los resultados conductuales, debido a que las deficiencias en la ejecución de las tareas podrían no ser causadas por interferencias con procesos mnemónicos. En algunos casos los efectos pueden ser causados por interferencias con variables motoras, perceptuales o motivacionales. Además, las mismas variables podrían estar siendo influenciadas por el entrenamiento incrementado. En cambio, la administración del tratamiento inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de evitación pasiva nos permite descartar la participación de estas variables en el efecto protector contra la amnesia producida por CHX. Existe un único reporte en el cual un inhibidor de síntesis de proteínas se administra inmediatamente después del entrenamiento en una tarea de evitación activa, y produce una reversión de la amnesia (Flexner y Flexner, 1966). Sin embargo, esta tarea requiere de muchos ensayos y por lo tanto el almacenamiento de la memoria podría estar ocurriendo antes de que el fármaco sea administrado. En dicho estudio, la reversión de la amnesia se manifiesta en un periodo de tiempo posterior al momento en que la amnesia se ha establecido. Por otro lado, el efecto protector no puede ser explicado como un aceleramiento de los procesos de almacenamiento de la memoria (Parent y cols., 1994), ya que el efecto protector se sigue manifestando a pesar de que el tratamiento con CHX se administre antes del entrenamiento como se ha visto en este trabajo y en otros reportes (Flood y cols., 1972; Flood y cols., 1973). En el presente estudio, la CHX no produjo deficiencias significativas en la memoria de corto plazo. La ausencia de deficiencias, que se observan como una mayor cantidad de tiempo requerida para cruzar al compartimento de castigo no puede ser explicada por deterioros motores debido a que el mismo

procedimiento experimental, pero sin administrar el choque eléctrico, no produce diferencias entre el grupo tratado con vehículo y el grupo con CHX en la latencia de entrenamiento, y en las latencias de retención 30 min después. Estos resultados extienden hallazgos previos en los que el incremento en la intensidad del choque eléctrico durante el entrenamiento previene la amnesia retrógrada. Se han observado resultados similares en los efectos producidos por dosis amnésicas del anticolinérgico escopolamina (Cruz-Morales y cols., 1992; Durán-Arévalo y cols., 1990) o del depletador de serotonina, p-cloroanfetamina (Solana-Figueroa y cols., 2002) administradas por vía sistémica.

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio podrían tener varias interpretaciones. La primera es que a pesar de la inhibición de síntesis de proteínas existe una síntesis remanente, la cual podría ser suficiente para la formación de la memoria de largo plazo bajo condiciones de sobrerreforzamiento. Previamente se ha mostrado que la dosis usada deteriora la consolidación de la memoria en ratas y se ha reportado que produce una inhibición de síntesis de proteínas cerebrales en la rata de alrededor del 70% y que dicha inhibición disminuye hasta un 23 % a las 6 h (Milekic y cols., 2006; Squire y cols., 1980). En las mediciones de la inhibición de síntesis de proteínas obtuvimos valores similares de los 15 a 60 min después de la inyección de CHX y además se encontró que el entrenamiento en la tarea de evitación incrementada no modifica de forma significativa el grado de inhibición producido por la CHX. Por lo tanto, los tratamientos de CHX administrados antes o después del entrenamiento que utilizamos, inhiben la síntesis de proteínas en la mayor parte de los momentos que se ha reportado son sensibles a la inhibición de síntesis de proteínas en tareas de evitación pasiva, alrededor del momento del entrenamiento, y a las 3-6 h post-entrenamiento (Quinton y Kramacy, 1977; Quevedo y cols., 1999; Bourtchouladze y cols., 1998; Freeman y cols., 1995). Sin embargo, esta dosis deja un remanente de alrededor del 30 al 40% en la síntesis de proteínas cerebrales. Desafortunadamente la dosis de CHX usada es muy cercana a la dosis letal (Sigma-Aldrich, Material Safety Data Sheet), por lo que no es posible producir un mayor grado de inhibición sin matar a los animales. No obstante, en el ratón dosis mucho mayores pueden ser administradas y producen niveles de inhibición de hasta un 95%. Aún en estas condiciones, la amnesia producida por ISPs administrados poco antes del entrenamiento es reversible (Quartermain y cols., 1970; Rainbow y cols., 1980; Squire y Barondes, 1972).

Por vía subcutánea, dosis amnésicas de ISPs en ratón producen una inhibición que parece ser relativamente homogénea. Con CHX se ha reportado que es similar entre la corteza y la subcorteza (Flood y cols., 1972) y con anisomicina el nivel de inhibición en el hipocampo es similar a mediciones en el cerebro completo (Wanisch y Wotjak, 2008; Rainbow et al., 1980). En rata no se ha medido la inhibición en estructuras cerebrales particulares, pero es probable que sigan un patrón similar al del ratón, aunque no puede descartarse lo contrario. Esto sugiere que la síntesis de proteínas en la mayor parte de los cúmulos neuronales que participan en el almacenamiento de la memoria se encuentra a groso modo inhibida por la CHX en niveles similares a los que determinamos en el cerebro completo. A la fecha no hay indicación alguna que sugiera la existencia de algún mecanismo especial en neuronas específicas o estructuras cerebrales que selectivamente impida el bloqueo de la síntesis de proteínas, así como tampoco en modelos más simples como *Aplysia*.

En conjunto, hay poco margen para considerar que la síntesis de proteínas remanente permita el almacenamiento de la memoria. Otra posibilidad, es que la síntesis de proteínas sea necesaria para la formación de la memoria de largo plazo, y que esta síntesis se pospone hasta el momento en que el efecto del fármaco decae, lo cual no excluye la primera posibilidad en los casos en los que la inhibición no es completa. La evidencia a favor de esta segunda interpretación, es que la administración de dosis repetidas de ISPs que prolongan la inhibición sean capaces de bloquear el efecto protector contra la amnesia ejercido por el entrenamiento aumentado (Flood y cols., 1973; Flood y cols., 1975a). Sin embargo, ninguna de estas interpretaciones es consistente con la evidencia de la que la amnesia producida con ISPs puede revertirse farmacológicamente. Más aún, se ha encontrado que los fármacos que revierten la amnesia, en todos los casos en los que se ha estudiado su efecto sobre la síntesis de proteínas, tienen un efecto pobre o nulo sobre la síntesis de proteínas, así como sobre el grado y duración de la inhibición producida por los ISPs (Hall y cols., 1976; Martínez y cols., 1981; Quartermain y cols., 1977). Además la amplia variedad de efectos inespecíficos producidos por los ISPs podría ser la causa del efecto amnésico. Algunos de estos efectos inespecíficos pueden ocurrir aún en dosis en las que la inhibición de síntesis de proteínas es relativamente baja (Edwards y Mahadevan, 1992; Hazzalin y cols., 1998; Mahadevan y Edwards, 1991).

Es relevante mencionar, que las incongruencias entre la evidencia como la arriba mencionada y la teoría del requerimiento de síntesis de proteínas para la formación de la MLP han sido notadas recientemente por otros investigadores del campo y les ha llevado a buscar modelos alternativos. Como parte de uno de ellos, se ha propuesto que la síntesis de proteínas podría jugar un papel permisivo y no uno central en la formación de la memoria. Es decir que, las proteínas sintetizadas *de novo* tendrían una función homeostática de reponer otras proteínas, principalmente de aquellas con una vida media corta, con mayor susceptibilidad a proteólisis, y/o después de una estimulación intensa en donde el recambio de proteínas podría ser más acelerado, y que las proteínas ya existentes en la sinapsis serían las encargadas de producir los cambios que subyacen a la traza mnemónica (Routtenberg y Rekart, 2005). En conjunción con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podría especularse que al menos bajo condiciones de sobrerreforzamiento, la participación de las proteínas preexistentes es suficiente para la formación de memorias de largo plazo. En congruencia con esta concepción, evidencia reciente sugiere que la formación de la memoria podría requerir solo de la activación de proteínas ya existentes. Mediante el uso de inhibidores de síntesis de proteínas, nucleótidos antisentido contra el BDNF (brain-derived neurotrophic factor), o tPA-STOP (un inhibidor de la activación de BDNF por proteólisis del precursor proBDNF) se ha encontrado que la formación de la memoria de largo plazo una tarea de miedo contextual, depende de la activación de BDNF. El mismo mecanismo en ausencia de síntesis de proteínas parece ser suficiente para el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP); el principal modelo de plasticidad sináptica que ha guiado en los últimos años la búsqueda de los mecanismos moleculares que subyacen a la memoria (Barnes y Thomas 2008; Lu et al., 2008; Pang y cols., 2004; Routtenberg y Rekart, 2005). Otros autores han encontrado que algunas formas de plasticidad sináptica pueden ocurrir en ausencia de síntesis de proteínas, tal es el caso de un tipo de facilitación a largo plazo en *Aplysia*, así como una forma de depresión de largo plazo en el hipocampo de la rata, que son modelos de plasticidad sináptica asociados con la formación de la memoria, pueden ocurrir en ausencia de síntesis de proteínas (Bailey y cols., 2000; Poschel y Manahan-Vaughan, 2007). La importancia de estos reportes es que demuestran que en ausencia de síntesis de proteínas pueden ocurrir la clase de que cambios sinápticos persistentes que se piensa forman parte de los mecanismos subyacentes del almacenamiento

de la memoria de largo plazo y por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo no se encuentran en contradicción con dicha idea.

Otro aspecto que podría tener relevancia en efecto protector del sobrerreforzamiento es el papel del estrés. El entrenamiento en condiciones de sobrerreforzamiento presupone un mayor nivel de estrés que en los entrenamientos con intensidades de choque más bajas. Es bien conocido que las hormonas liberadas durante situaciones de estrés tienen un efecto modulador de la memoria, y bajo determinadas condiciones producen mejoramiento o deterioro de la misma (McGaugh y Roozendaal, 2002; Roozendaal y cols., 1997). Un amplio cúmulo de evidencia indica que el estrés agudo causa alteraciones en la plasticidad sináptica y que esta podría ser la causa de sus efectos en el aprendizaje y la memoria (Hirata y cols., 2008; 2009; Howland y Wang 2008; Yarom y cols., 2008). Las alteraciones plásticas producidas por el estrés no solo parecen estar relacionadas en memoria, sino también con procesamiento emocional, y en ambos efectos del estrés, participan de forma promiscua elementos como el BDNF, que parecen ser indispensables para la formación de la memoria (Govindarajan y cols., 2006; Hünnerkopf y cols 2007; Marmigere y cols., 2003). Cabe mencionar que todas las experiencias de aprendizaje producen estrés en diferentes grados, entre otras causas porque implican por lo general situaciones de novedad, incluso cuando se usan reforzadores positivos. En el caso de las ratas, es bien conocido que son por naturaleza neofóbicas, por lo que resulta complicado aislar las respuestas de estrés *per se*, de otros aspectos importantes en la formación de la memoria, como el valor reforzante del estímulo, los eventos celulares y moleculares que se encuentran asociados con la formación de la memoria, y las interacciones entre estos factores. Aunque *a priori* resulta evidente que la intensidad del choque eléctrico podría dar diferentes respuestas de estrés al menos de forma cuantitativa, queda por determinar el grado de participación del estrés en el efecto protector contra la amnesia producida por CHX.

En resumen, y poniendo en duda a la universalidad de la teoría más aceptada acerca de la participación de la síntesis de proteínas en la consolidación de la memoria, todos estos datos en conjunto permiten proponer que bajo condiciones de entrenamiento incrementado la síntesis de proteínas deja de ser necesaria para la formación de la memoria de largo plazo.

10. CONCLUSIÓN

En ratas, el entrenamiento en la tarea de evitación pasiva bajo condiciones de elevada intensidad de choque eléctrico, ejerce un efecto protector contra la amnesia producida por el inhibidor de síntesis de proteínas CHX. Por lo que se concluye que el requerimiento de síntesis de proteínas para la formación de la memoria de largo plazo es cuestionable.

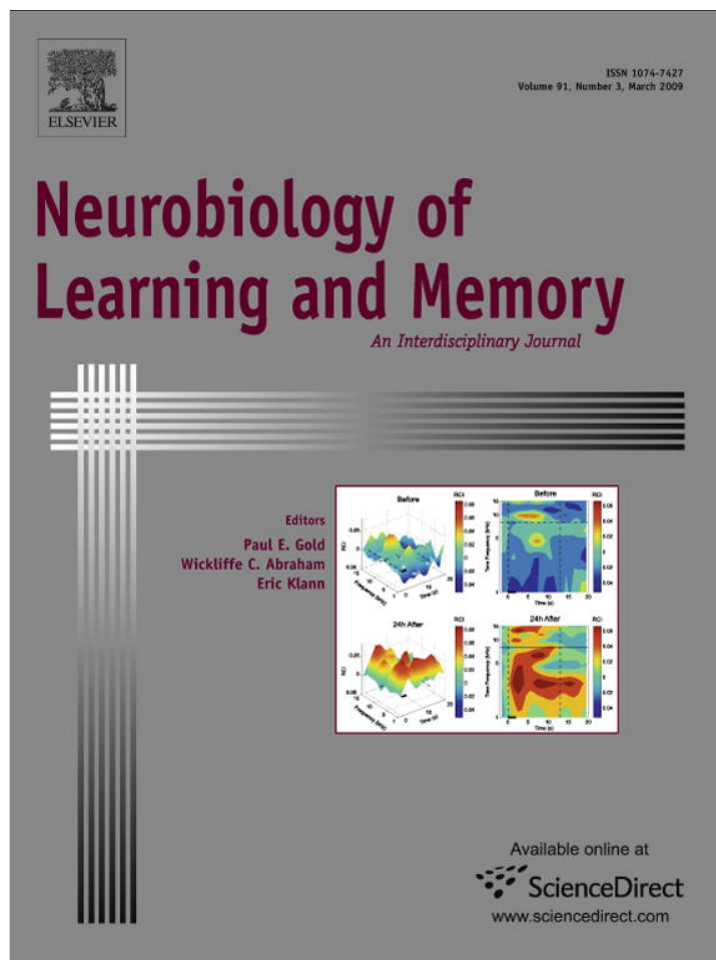
12. APÉNDICE A. ABREVIATURAS

ACX	Acetocicloheximida
a-MPT	a-metil-p-tyrosina
ANI	Anisomicina
Ci	Curie
CREB	Elemento de unión en respuesta a adenosin monofosfato cíclico
CPM	Cuentas por minuto
CHX	Cicloheximida
DTT	Dithiothreitol
ERK1/2,	Cinasa regulada por señal extracelular 1/2
g	Fuerza g
ISP	Inhibidor de síntesis de proteínas
JNK,	c-Jun N-terminal cinasa
LTD	Depresión de largo plazo
MAPK	Proteína Cinasa activada por mitógeno
MCP	Memoria de corto plazo
mM	Milimolar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris-Cl	Cloruro de Tris (hidroximetil)aminometano
VEH	Vehículo

13. APÉNDICE B. PUBLICACIÓN

Díaz-Trujillo A, Contreras J, Medina AC, Silveyra-León GA, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. 2009. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol Learn Mem.* Mar;91 (3):310-4. Epub 2008 Nov 28.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

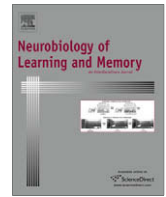
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynlme

Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor

Arnulfo Díaz-Trujillo^a, Joey Contreras^c, Andrea C. Medina^a, Gerardo A. Silveyra-Leon^a, Anaïd Antaramian^b, Gina L. Quirarte^a, Roberto A. Prado-Alcalá^{a,*}

^aDepartamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro 76230, Mexico

^bUnidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^cUniversity of California, Irvine, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2008

Revised 23 October 2008

Accepted 25 October 2008

Available online 28 November 2008

Keywords:

Inhibitory avoidance

Memory consolidation

Cycloheximide

Protein synthesis inhibition

Enhanced learning

Long-term memory

ABSTRACT

Interference with activity of numerous cerebral structures produces memory deficiencies; in many instances, however, when animals are over-trained such interference becomes innocuous. Systemic administration of protein synthesis inhibitors impairs long-term retention; this effect has been interpreted to mean that protein synthesis is required for memory consolidation, though little is known about the effect of protein synthesis inhibitors on memory of enhanced learning in the rat. To further analyze the protective effect of enhanced learning against amnesic treatments, groups of Wistar rats were trained in a one-trial step-through inhibitory avoidance task, using different intensities of foot-shock during training. Cycloheximide (CXM; 2.8 mg/kg), an inhibitor of protein synthesis, was injected either 30 min before training or immediately after training. Twenty-four hours after training retention latencies were recorded. Our data showed that both pre- and post-training administration of CXM produced amnesia in those groups that had been trained with relatively low foot-shock intensities, but no impairment in retention was observed when relatively high intensities of foot-shock were administered. These and similar results lead us to conclude that protein synthesis inhibitors may interfere with memory consolidation, but their effect disappears when animals are submitted to an enhanced learning experience, calling into question the idea that protein synthesis is required for memory consolidation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The notion that memory consolidation is mediated by protein synthesis is based on a wide collection of experimental data (Davis & Squire, 1984). In mice, systemic administration of protein synthesis inhibitors (PSIs) with different mechanisms of action produce significant impairment of long-term memory in a variety of learning tasks; the amnesia produced by this type of drug is dose-dependent and seems to be correlated with the degree of protein synthesis inhibition (for reviews consult Davis & Squire, 1984; Gold, 2008; Martinez, Jensen, & McGaugh, 1981; Routtenberg & Rekart, 2005). Long-term memory impairment by PSIs has also been reported in birds (Bull, Ferrera, & Orrego, 1976; Freeman, Rose, & Scholey, 1995), fish (Agranoff, Davis, & Brink, 1965) mollusks (Agin, Chichery, Maubert, & Chichery, 2003; Crow & Forrester, 1990) insects (Barraco, Lovell, & Eisenstein, 1981; DeZazzo & Tully, 1995) and earthworms (Watanabe et al., 2005). This evidence indicates that some protein-dependent mechanisms of memory storage are highly preserved along the phylogenetic scale. Under

certain conditions, however, doses of PSIs that produce a degree of inhibition near or greater than 90% for several hours do not hinder long-term memory (Barondes & Cohen, 1967a; Flexner & Flexner, 1966), or they produce amnesia followed by spontaneous recovery from it (Flexner, Flexner, & Roberts, 1966; Serota, 1971; Squire & Barondes, 1972). Recovery from PSI-induced amnesia can also be brought about by means of certain experimental manipulations such as administration of reminder stimuli (Quartermain, McEwen, & Azmitia, 1970) or of a wide variety of excitatory drugs that do not affect the duration or degree of inhibition produced by PSIs (Martinez et al., 1981), and by extended training (Barondes & Cohen, 1967b). Also, increased strength of training impedes the amnesic effect of PSIs (Flood, Bennett, Orme, & Rosenzweig, 1975; Flood, Bennett, Rosenzweig, & Orme, 1972). A common feature of these experiments is that mice were used as experimental subjects, thus leaving the question of whether these negative results are peculiar to this species or are, in fact, phenomena that can be generalized to other species. Many studies have shown that amnesia is produced by a variety of treatments that interfere with cerebral activity, and that such treatments become innocuous when the strength of training is increased (Prado-Alcalá et al., 2007), but to our knowledge there are no published studies in rats

* Corresponding author. Fax: +52 442 238 1046.

E-mail address: prado@servidor.unam.mx (R.A. Prado-Alcalá).

showing that, as is the case in mice, the strength of training alters the amnesic properties of PSIs. In an attempt to investigate if increased strength of training also protects against the amnesic properties of PSIs in rats, we explored the effects of both pre- and post-training subcutaneous administration of cycloheximide (CXM) on memory consolidation of inhibitory avoidance learning produced with different intensities of foot-shock. If protein synthesis is obligatory for memory consolidation, then subcutaneous administration of CXM either prior to or after inhibitory avoidance training will produce amnesia that will not be prevented by increasing the strength of training.

2. Materials and methods

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México and were in compliance with “Principles of Laboratory Animal Care” of the National Institutes of Health.

2.1. Animals

The subjects were naive male Wistar rats (250–350 g) maintained in a room with a 12 h/12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h) and housed individually in acrylic cages with food and tap water ad libitum. The temperature of the various rooms in which they were reared and maintained was a constant 21 °C. They were kept in these conditions for at least 5 days before the experiments were initiated. The subjects were randomly assigned to each group; sample size ranged from 10 to 12 rats per group.

2.2. Apparatus

The training and testing were carried out in an apparatus specifically designed to study one-trial step-through inhibitory avoidance learning. The apparatus was an alley with two distinct compartments, separated by a guillotine door. The starting compartment (30 cm long, 25 cm deep, and 30 cm wide) had walls and a lid of red-colored acrylic with a floor of stainless steel bars (6 mm in diameter, separated by 9 mm), and was illuminated by a 10-W light bulb located in the center of its lid. The other non-illuminated compartment had front and back walls and floor made of stainless steel plates with its end walls and lid constructed of red-colored acrylic. The compartment was 30 cm long and 25 cm deep. The walls and floor were shaped like a trough, 20 cm wide at the top and 8 cm wide at the bottom. In the middle of the floor, a 1.5 cm slot separated the two stainless steel plates that made up the walls and floor. When in this compartment, the rats were in contact with both plates through which foot-shock was delivered. The apparatus was cleansed with 10% alcohol and rinsed with tap water before and after each rat occupied it. A square-pulse stimulator (Grass Model No. S-48) in series with a constant current unit (Grass Model No. CCU-1A) generated the foot-shock. Automated equipment controlled the duration of foot-shock and measured the rats' latencies to cross from one compartment to the other. The apparatus was located inside a dark, soundproof room provided with background masking noise (BRS/LVE, Model No. AU902).

2.3. Training and testing

On the day of training each animal was put inside the safe compartment; 10 s later the door dividing the two compartments was opened and the latency to cross to the other compartment was measured (training latency). When the animals crossed to this

compartment the door was closed and a foot-shock was delivered; intensities will be specified below. Five seconds later the door was reopened allowing the animal to escape to the safe compartment and the stimulator was turned off; this latency was also measured (escape latency). After 30 s in the safe compartment the animal was put back in its home cage. Twenty-four hours later, during the retention test, the same procedure was followed except that the foot-shock was not delivered; if the animal did not cross to the second compartment within 600 s a retention latency score of 600 was assigned, and the session ended.

2.4. Treatments

In each behavioral experiment two treatments were administered, subcutaneously: CXM or its vehicle. A dose of 2.8 mg/kg of CXM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was chosen because it produces amnesia in rats (Gold & Sternberg, 1980; Milekic, Brown, Castellini, & Alberini, 2006). CXM was dissolved in 1% DMSO in isotonic saline (vehicle solution).

2.5. Statistical analyses

Mann–Whitney U tests were used to compare latency scores between each CXM group and its respective vehicle control group.

3. Experiment 1

Although it is well documented that immediate post-training administration of PSIs produces amnesia of avoidance learning in mice (Judge & Quartermain, 1982; Kameyama, Nabeshima, & Kozawa, 1986) little is known about their effect on memory of avoidance learning in rats. This experiment had two goals: (a) to confirm the amnesic effect of CXM on inhibitory avoidance found in rats (Gold & Sternberg, 1980), and (b) to determine whether relatively high foot-shock intensities counteract the amnesic effect in this species. Two groups of rats were trained with 0.6, 0.8, 1.0, or 2.0 mA: for each intensity one group was injected with 2.8 mg/kg of CXM and the other with the vehicle solution. CXM and vehicle were administered subcutaneously, immediately after inhibitory avoidance training.

3.1. Results

There were no significant differences in training and escape latencies between each experimental group and its control group. When each of the CXM groups was compared with its respective vehicle control group, it was found that post-training injection of CXM produced a significant retention deficit in the low-intensity groups (0.6, 0.8, and 1.0 mA; p values < .01, .02, and .05, respectively). In marked contrast, post-training administration of CXM in the group that had been trained with 2.0 mA caused no impairment of retention at all (Fig. 1).

4. Experiment 2

The results of Experiment 1 confirmed the amnesic effect of CXM, and strongly suggested that higher intensity training protected against such an effect. However, after the post-training administration of CXM, there is a time window between the moment of injection and the onset of protein synthesis inhibition, thus leaving an alternative explanation for the protective effect of enhanced learning, namely that the higher foot-shock used for training may have accelerated the consolidation process. If this were the case, then the absence of amnesia seen in Experiment 1 might be explained not by CXM having no effect, but by completion of consolidation before protein synthesis was significantly inhibited.

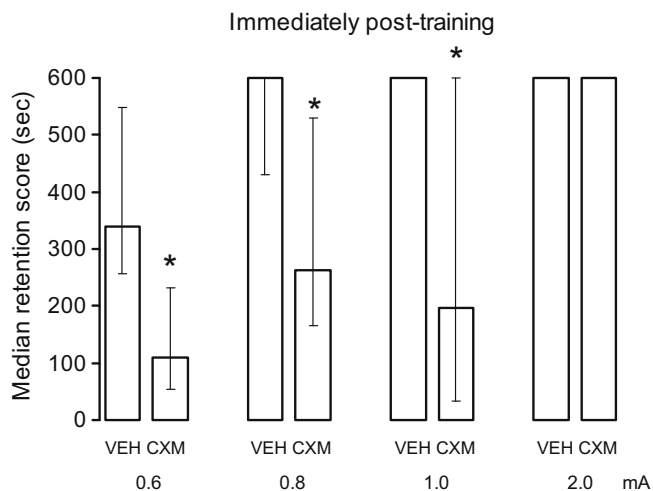


Fig. 1. Median retention scores (with interquartile ranges) of groups of rats that were trained in inhibitory avoidance using 0.6, 0.8, 1.0, or 2.0 mA and treated, sc, with 2.8 mg/kg of cycloheximide (CXM) or vehicle solution (VEH) immediately post-training. Amnesia was produced in all groups, except for the group that was trained with the highest intensity of foot-shock. $p < .05$ vs. VEH.

A direct way of testing this hypothesis is to reduce to zero the time window between training and initiation of the effects of CXM thus eliminating the possibility of accelerating the consolidation process. To this end, vehicle and CXM were administered subcutaneously 30 min before inhibitory avoidance training. This interval between injection and training was chosen because it has been shown that in mice it produces amnesia of inhibitory avoidance (e.g., Dunn, Gray, & Iuvone, 1977) and because in the rat, the dose of CXM used in the present study produces maximal protein synthesis inhibition at 30 min post-injection (see Experiment 4 of this series).

When Experiment 2 was initiated we found that the lowest of the foot-shock intensities used in Experiment 1 (0.6 mA) did not produce significant retention scores, either in the vehicle or in the CXM group injected 30 min before training (data not shown). These results indicated that, in our experimental conditions, memory is more labile when animals are subjected to pre-training manipulations as compared to post-training manipulations. For this reason we decided to increase the level of stimulation; thus, training was conducted with 0.8, 2.4 and 3.2 mA.

4.1. Results

The pre-training treatments caused no significant differences between the CXM groups and their respective control groups regarding training and escape latencies. By contrast, when CXM was administered 30 min before training it produced amnesia in the 0.8 mA group ($p < .02$ vs. vehicle), but not in the 2.4 and 3.2 mA groups, as depicted in Fig. 2.

5. Experiment 3

The results of Experiment 2 indicated that pre-training CXM administration produced low retention scores in rats trained with relatively low foot-shock intensities. Without proper control manipulations, however, a straightforward interpretation of these data cannot be offered for the following reasons: (1) given that the animals had been trained under the influence of CXM but tested in a non-drugged state, the deficit in retention might have been due to state-dependency; (2) because the drug was administered before training and the tests of retention were run 24 h later,

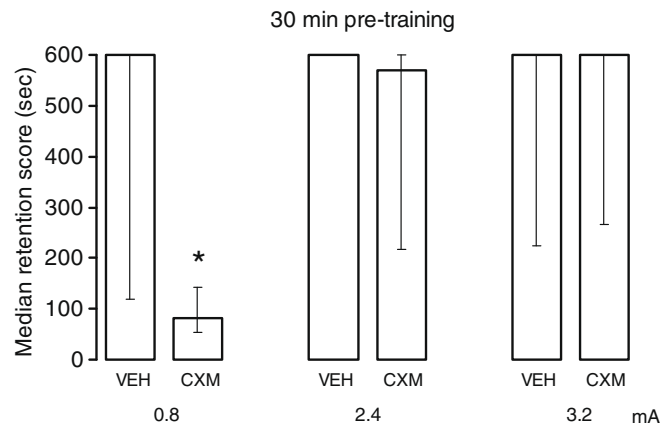


Fig. 2. Median retention scores (with interquartile ranges) of groups of rats that were trained in inhibitory avoidance with 0.8, 2.4, or 3.2 mA, and treated, sc, with 2.8 mg/kg of cycloheximide (CXM) or vehicle solution (VEH) 30 min before training. Amnesia was produced in the group trained with the lowest, but not in those trained with higher foot-shock intensities. $p < .05$ vs. VEH.

it was not clear whether there was an interference with acquisition or consolidation; (3) very high latency scores were measured 30 min after training (see below); the high scores shown by the CXM-injected rats, rather than indicative of good retention of the task, might reflect impaired motor activity due to illness or other proactive incapacitating effects of CXM. Consequently, these uncertainties were resolved appropriately as follows.

Independent groups of rats were injected with CXM or vehicle 30 min before being assigned to one of the following conditions: (A) Trained with 0.8 mA and injected again 30 min before the retention test carried out 24 h later; a retention deficit in the CXM group would argue against state-dependency. (B) Trained with 0.8 mA and tested for retention 30 min later; retention impairment at the 30 min retention test would suggest an effect on learning, while the lack of retention impairment would suggest interference with memory consolidation. (C) "Trained" without foot-shock and tested 30 min later; a lack of differences between the two groups pre-injected with vehicle or CXM in training and retention latencies would suggest that CXM did not interfere with motor activity that might have confounded the behavioral results when short-term memory was measured in the experimental condition (C).

5.1. Results

As shown in Fig. 3A, there was significant amnesia in the group that received CXM injections both before training and before retention testing. The groups that were treated with vehicle or CXM displayed excellent retention scores when tested 30 min after training (Fig. 3B). Lastly, the latency scores measured during the test session run 30 min after training of the vehicle and CXM groups that did not receive foot-shock did not differ from each other (Fig. 3C), and were not statistically different from their respective latency scores in the training session (training and retention scores: 17.8 and 22.5 for the vehicle group; 25.4 and 13.6 for the CXM group).

6. Experiment 4

In order to establish an appropriate interval between treatment administration and training (Experiments 2 and 3), we measured the amount of protein synthesis inhibition at 15, 30, and 60 min after CXM injection. Groups of rats ($n = 4$) were injected, sc, with CXM or vehicle solution and sacrificed at 15, 30, or 60 min later. Fifteen min before sacrifice the rats were injected, ip, with

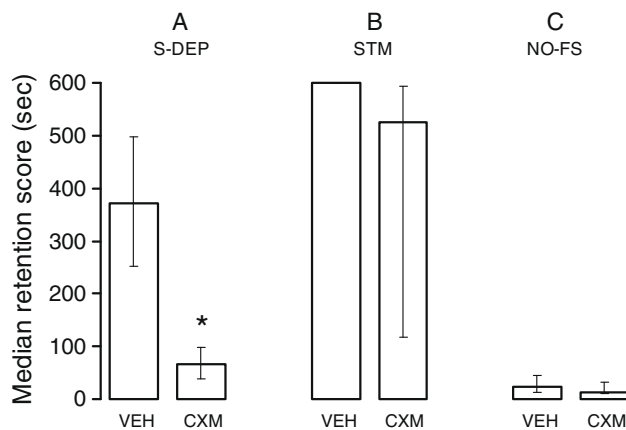


Fig. 3. Median retention scores and interquartile ranges obtained after training of one-trial inhibitory avoidance with 0.8 mA. Rats were injected, sc, 30 min before training with vehicle (VEH) or 2.8 mg/kg of cycloheximide (CXM). (A) Injected again 30 min before the retention test carried out 24 h later to test for state-dependency (S-DEP). (B) Tested for retention 30 min later, to test for short-term memory (STM). (C) "Trained" without foot-shock and tested 30 min later (NO-FS). * $p < .05$ vs. VEH.

125 μ Ci L-[³⁵S] methionine; additionally, to determine whether inhibitory avoidance training with a high foot-shock (2.0 mA) reduces the effectiveness of CXM in inhibiting protein synthesis, rats were trained with 2.0 mA and injected with CXM or vehicle immediately after training. These animals were sacrificed 30 min later. The brains were homogenized in cold lysis buffer (1% SDS, 60 mM Tris-Cl, pH 7.4, 62.4 mM imidazole, 40 mM DTT, 10% glycerol) and boiled for 5 min. One milliliter of each homogenate was vigorously stirred with 1 ml of 20% trichloroacetic acid, and centrifuged at 1000g for 4 min at room temperature to precipitate the proteins. The protein pellet was resuspended in scintillation fluid. The protein content was quantified from the homogenate solution using the Bradford method (Bradford, 1976). Protein synthesis inhibition was calculated as follows: $[1 - (\text{CPM per mg of protein CXM}/\text{CPM per mg protein VEHICLE})] \times 100$.

6.1. Results

The degree of protein synthesis inhibition was 58%, 68%, and 64% at 15, 30, and 60 min, respectively. The inhibition was 64% in the group that had been trained with 2.0 mA. Milekic et al. (2006) measured inhibition of protein synthesis in rats at 60 min and 6 h after administering the same dose of CXM used in the present experiment. Our measurement made at 60 min agrees well with that reported by them. At 6 h after CXM injection they found a 23% inhibition of synthesis.

7. Discussion

The present study was based on the commonly held view that memory consolidation is dependent upon newly synthesized brain proteins (e.g., Davis & Squire, 1984; Kandel, 2002; Nader, 2003). Consequently, it was expected that pre- and post-training administration of a protein synthesis inhibitor would produce an amnesic state that would not be attenuated by increasing the intensity of training. If, on the other hand, strong training impeded the amnesic effect of the protein synthesis inhibitor then it would be evident that new protein formation is not essential for memory consolidation. Our data showed that the general finding that systemic administration of PSIs produces amnesia in mice is also applicable to the rat. More interesting, however, was the finding that strong training protects against the inhibitory effect of CXM on memory in this species.

Experiment 1 showed that immediate post-training administration of CXM impaired retention of inhibitory avoidance that had been trained with relatively low foot-shock intensities that, nonetheless, yielded high retention scores in the control groups, supporting a requirement for protein synthesis. However, increasing the intensity of the aversive stimulation prevented the impairing effect of CXM. This result can be interpreted in at least two ways. First, that the failure of CXM to interfere with memory indicates that protein synthesis is not necessary for memory consolidation of strong learning, or second, that with strong learning the consolidation process was completed before CXM had exerted its disruptive effects, i.e., consolidation took place in less than 30 min, which is the latency to obtain the maximum inhibition of cerebral protein synthesis with CXM.

Experiment 2 was designed to distinguish between these two possibilities. Training was conducted 30 min after CXM injection, when the maximum inhibition of cerebral protein synthesis was achieved, as indicated by the results of Experiment 4. Under these conditions, perfect retention scores were obtained by the groups that had been trained with the higher foot-shock intensities. Since learning and whatever early mechanisms were responsible for memory consolidation took place under the influence of CXM, it is reasonable to suppose that protein synthesis was not involved in these processes.

CXM-treated rats that were subsequently trained with a low-intensity foot-shock showed a marked retention deficit. However, pre-training treatments do not lend themselves to clear-cut interpretations of behavioral results. The deficiency in retention might have been due to impaired learning or impaired memory consolidation, state-dependency, or interference with other non-mnemonic processes such as motor, sensory, or additional variables that are necessary for normal performance. Experiment 3 dealt with these possibilities.

State-dependency was ruled out because CXM produced amnesia when it was administered both 30 min before training and 30 min before retention testing (Fig. 3A). The idea that the amnesic effect of CXM was due to an impediment of consolidation and not of learning was confirmed by the fact that treated animals showed excellent short-term memory scores when tested 30 min after training, which indicates that they had learned the conditioned response (Fig. 3B). This high retention cannot be explained by a potential motor impairment, because crossover latencies during training were not different between vehicle and CXM-treated groups and because when latency scores were measured 30 min after "training" without foot-shock in CXM and control rats, no differences were found between these groups with regard to either their training (data not shown) or retention latencies (Fig. 3C). Also, detection of the foot-shock was not impaired by CXM because in all instances where CXM was administered before training (Experiments 2 and 3), no significant differences in escape latencies were found; thus, the inference can be made that the afferent and efferent processes necessary to perceive and react to the aversive stimulation were not hindered by the drug.

An important issue that arises from our results and from similar published results relates to the interpretation of the amnesic effect of cycloheximide (and other PSIs) when shock intensity is weak. Many experiments have shown that the amnesic effects of PSIs are overcome or attenuated by a wide variety of treatments that do not reverse the inhibition of protein synthesis. It has been shown, for example, that strychnine attenuates amnesia of inhibitory avoidance training induced by anisomycin (Flood, Jarvik, Bennet, Orme, & Rosenzweig, 1977), that lysine vasopressin and arginine-vasopressin attenuate puromycin-induced amnesia in a Y-maze avoidance task (Walter, Hoffman, Flexner, & Flexner, 1975), and that amphetamine and phenoxybenzamine (an α -adrenergic antagonist) attenuate amnesia of avoidance learning resulting

from several protein synthesis inhibitors including CXM (Barondes & Cohen, 1968; Flood et al., 1977; Gold & Sternberg, 1978; Oliver, Rose, Brimblecombe, & Livett, 1979; Quinton & Bloom, 1977; Serota, Roberts, & Flexner, 1972). Amphetamine, like strychnine, does not reverse the inhibition of protein synthesis induced by puromycin and anisomycin (Flood et al., 1977; Hall, Schlesinger, & Stamm, 1976). Along these lines it was recently reported that intra-amygdalar infusion of an amnesic dose of anisomycin induces a huge release of norepinephrine, serotonin, and dopamine; the amnesic effect can be mimicked or attenuated by manipulating norepinephrine, independently of protein synthesis inhibition (Canal, Chang, & Gold, 2007). This and previous experiments have led to the general conclusion that the impairing effect of PSLs on memory is not due to the inhibition of protein synthesis but to nonspecific effects on neural and endocrine systems (for reviews, see Gold, 2008; Martinez et al., 1981; Routtenberg & Rekart, 2005). Thus, amnesia associated with systemic injections of PSLs appears to be the product of their negative influence on the neural and endocrine processes that modulate memory formation. If so then one might propose that that cycloheximide fails to produce amnesia when shock is strong because strong shock activates these modulation systems in a way that counters this effect of PS inhibitors, whereas weak shock does not.

In sum, it appears that the protection afforded by strong training against the amnesic effect of cycloheximide is independent of protein synthesis and of other nonspecific effects of this drug. More research is needed to shed light on this issue.

Acknowledgments

The authors thank A. Méndez, N. Serafin, O. González, and M. García for their excellent technical assistance, and Dr. D. Pless for proof-reading the manuscript. Supported by grants DGAPA-PAP-IIT-UNAM (IN211608 and IN216708), and CONACYT (Project 82158). This work was carried out in partial fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) by A. Díaz-Trujillo, who was a recipient of a Graduate Scholarship from CONACYT (169781). J. Contreras was sponsored by the Minority Health and Health Disparities International Research Training (MHIRT) of University of California-Irvine (Grant NIH MD-01485).

References

- Agin, V., Chichery, R., Maubert, E., & Chichery, M. P. (2003). Time-dependent effects of cycloheximide on long-term memory in the cuttlefish. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *75*, 141–146.
- Agranoff, B. W., Davis, R. E., & Brink, J. J. (1965). Memory fixation in the goldfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *54*, 788–793.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1967a). Comparative effects of cycloheximide and puromycin on cerebral protein synthesis and consolidation of memory in mice. *Brain Research*, *4*, 44–51.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1967b). Delayed and sustained effect of acetoxy cycloheximide on memory in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *58*, 157–164.
- Barondes, S. H., & Cohen, H. D. (1968). Arousal and the conversion of "short-term" memory to "long-term" memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *61*, 923–929.
- Barraco, D. A., Lovell, K. L., & Eisenstein, E. M. (1981). Effects of cycloheximide and puromycin on learning and retention in the cockroach, *P. americana*. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *15*, 489–494.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Bull, R., Ferrera, E., & Orrego, F. (1976). Effects of anisomycin on brain protein synthesis and passive avoidance learning in newborn chicks. *Journal of Neurobiology*, *7*, 37–49.
- Canal, C. E., Chang, Q., & Gold, P. E. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*, 12500–12505.
- Crow, T., & Forrester, J. (1990). Inhibition of protein synthesis blocks long-term enhancement of generator potentials produced by one-trial in vivo conditioning in *Hermisenda*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*, 4490–4494.
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin*, *96*, 518–559.
- DeZazzo, J., & Tully, T. (1995). Dissection of memory formation: From behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends in Neurosciences*, *18*, 212–218.
- Dunn, A. J., Gray, H. E., & Iuvone, P. M. (1977). Protein synthesis and amnesia: Studies with emetine and pactamycin. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *6*, 1–4.
- Flexner, L. B., & Flexner, J. B. (1966). Effect of acetoxy cycloheximide and of an acetoxy cycloheximide–puromycin mixture on cerebral protein synthesis and memory in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *55*, 369–374.
- Flexner, L. B., Flexner, J. B., & Roberts, R. B. (1966). Stages of memory in mice treated with acetoxy cycloheximide before or immediately after learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *56*, 730–735.
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Orme, A. E., & Rosenzweig, M. R. (1975). Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiology & Behavior*, *14*, 177–184.
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Rosenzweig, M. R., & Orme, A. E. (1972). Influence of training strength on amnesia induced by pretraining injections of cycloheximide. *Physiology & Behavior*, *9*, 589–600.
- Flood, J. F., Jarvik, M. E., Bennet, E. L., Orme, A. E., & Rosenzweig, M. R. (1977). The effects of stimulants, depressants, and protein synthesis inhibition on retention. *Behavioral Biology*, *20*, 168–183.
- Freeman, F. M., Rose, S. P., & Scholey, A. B. (1995). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiology of Learning and Memory*, *63*, 291–295.
- Gold, P. E. (2008). Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*, 201–211.
- Gold, P. E., & Sternberg, D. B. (1978). Retrograde amnesia produced by several treatments: Evidence for a common neurobiological mechanism. *Science*, *201*, 367–369.
- Gold, P. E., & Sternberg, D. B. (1980). Neurobiology of amnesia. *Science*, *209*, 837.
- Hall, M. E., Schlesinger, K., & Stamm, E. (1976). Prevention of memory loss following puromycin treatment. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *4*, 353–355.
- Judge, M. E., & Quartermain, D. (1982). Alleviation of anisomycin-induced amnesia by pre-test treatment with lysine–vasopressin. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *16*, 463–466.
- Kameyama, T., Nabeshima, T., & Kozawa, T. (1986). The antagonistic effects of naloxone on cycloheximide and anisomycin-induced amnesia. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *25*, 567–572.
- Kandel, E. R. (2002). The molecular biology of memory storage: A dialog between genes and synapses. *Bioscience Reports*, *21*, 565–611.
- Martinez, J. L., Jr., Jensen, R. A., & McGaugh, J. L. (1981). Attenuation of experimentally-induced amnesia. *Progress in Neurobiology*, *16*, 155–186.
- Milekic, M. H., Brown, S. D., Castellini, C., & Alberini, C. M. (2006). Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *Journal of Neuroscience*, *26*, 3010–3020.
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends in Neurosciences*, *26*, 65–72.
- Oliver, G. W. O., Rose, G. P., Brimblecombe, R. W., & Livett, B. H. (1979). Analysis of Y-maze learning in mice using cycloheximide. *General Pharmacology*, *10*, 489–497.
- Prado-Alcala, R. A., Salado-Castillo, R., Quiroz, C., Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Trujillo, A., Rivas-Arancibia, S., et al. (2007). Enhanced learning projects the brain against the effects of amnesic treatments. In F. Bermúdez-Rattoni (Ed.), *Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging* (pp. 175–191). London: Taylor and Francis Ltd.
- Quartermain, D., McEwen, B. S., & Azmitia, E. C. Jr., (1970). Amnesia produced by electroconvulsive shock or cycloheximide: Conditions for recovery. *Science*, *169*, 683–686.
- Quinton, E. E., & Bloom, A. S. (1977). Effects of d-amphetamine and strychnine on cycloheximide- and diethylthiocarbamate-induced amnesia in mice. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *91*, 1390–1397.
- Routtenberg, A., & Rekart, J. L. (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends in Neurosciences*, *28*, 12–19.
- Serota, R. G. (1971). Acetoxy cycloheximide and transient amnesia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*, 1249–1250.
- Serota, R. G., Roberts, R. B., & Flexner, L. B. (1972). Acetoxy cycloheximide-induced transient amnesia: Protective effects of adrenergic stimulants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*, 340–342.
- Squire, L. R., & Barondes, S. H. (1972). Variable decay of memory and its recovery in cycloheximide-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*, 1416–1420.
- Walter, R., Hoffman, P. L., Flexner, J. B., & Flexner, L. B. (1975). Neurohypophyseal hormones, analogs and fragments: Their effect on puromycin-induced amnesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*, 4180–4184.
- Watanabe, H., Takaya, T., Shimoi, T., Ogawa, H., Kitamura, Y., & Oka, K. (2005). Influence of mRNA and protein synthesis inhibitors on the long-term memory acquisition of classically conditioned earthworms. *Neurobiology of Learning and Memory*, *83*, 151–157.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agin V, Chichery R, Maubert E y Chichery MP. 2003. Time-dependent effects of cycloheximide on long-term memory in the cuttlefish. *Pharmacol Biochem Behav.* **75**: 141-146.
- Agranoff BW, Davis RE y Brink JJ. 1965. Memory fixation in the goldfish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **54**: 788-793.
- Altman HJ y Quartermain D. 1983. Facilitation of memory retrieval by centrally administered catecholamine stimulating agents. *Behav Brain Res.* **7**: 51-63.
- Bailey CH, Bartsch D y Kandel ER. 1996. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 13445-13452.
- Bailey CH, Giustetto M, Zhu H, Chen M y Kandel ER. 2000. A novel function for serotonin-mediated short-term facilitation in aplysia: conversion of a transient, cell-wide homosynaptic hebbian plasticity into a persistent, protein synthesis-independent synapse-specific enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 11581-11586.
- Barnes P y Thomas KL. 2008. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS ONE.* **3**(9):e3248.
- Barondes SH y Cohen HD. 1966. Puromycin Effect on Successive Phases of Memory Storage. *Science.* **151**: 594-595.
- Barondes SH y Cohen HD. 1967a. Comparative effects of cycloheximide and puromycin on cerebral protein synthesis and consolidation of memory in mice. *Brain Res.* **4**: 44-51.
- Barondes SH y Cohen HD. 1967b. Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **58**: 157-164.
- Barr RK y Bogoyevitch MA. 2001. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol.* **33**: 1047-1063.
- Barraco DA, Lovell KL y Eisenstein EM. 1981. Effects of cycloheximide and puromycin on learning and retention in the cockroach, *P. americana*. *Pharmacol Biochem Behav.* **15**: 489-494.

- Barrientos RM, O'Reilly RC y Rudy JW. 2002. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behav Brain Res.* **134**: 299-306.
- Bebien M, Salinas S, Becamel C, Richard V, Linares L y Hipskind RA. 2003. Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene.* **22**: 1836-1847.
- Bermúdez-Rattoni F. 1998. Codificación de la memoria. En "Revista de la Academia Mexicana de las Ciencias. CIENCIA", Vol. 49, pp. 23-28.
- Bermúdez-Rattoni, F. y Prado-Alcalá, R. A. Memoria. ¿En dónde está y cómo se forma? Editorial Trillas, 2001.
- Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I y Cammarota M. 2003. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci.* **17**: 897-902.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K y Kandel ER. 1998. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem.* **5**:365-74
- Botwinick CY y Quartermain D. 1974. Recovery from amnesia induced by pre-test injections of monoamine oxidase inhibitors. *Pharmacol Biochem Behav.* **2**: 375-379.
- Bozon B, Kelly A, Josselyn SA, Silva AJ, Davis S y Laroche S. 2003. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **358**: 805-814.
- Bull R, Ferrera E y Orrego F. 1976. Effects of anisomycin on brain protein synthesis and passive avoidance learning in newborn chicks. *J Neurobiol.* **7**: 37-49.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I y Medina JH. 2000. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance

- learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res.* **76**: 36-46.
- Canal CE, Chang Q y Gold PE. 2007. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**: 12500-12505.
- Cobos-Zapiain GG, Salado-Castillo R, Sánchez-Alavez M, Quirarte GL, Roldán-Roldán G, Díaz del Guante MA y Prado-Alcalá RA. 1996. High Level of Footshock during Inhibitory Avoidance Training Prevents Amnesia Induced by Intranigral Injection of GABA Antagonists. *Neurobiology of Learning and Memory.* **65**: 202-206.
- Crow T y Forrester J. 1990. Inhibition of protein synthesis blocks long-term enhancement of generator potentials produced by one-trial in vivo conditioning in Hermisenda. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**: 4490-4494.
- Cruz-Morales SE, Durán-Arevalo M, Diaz Del Guante MA, Quirarte G y Prado-Alcalá RA. 1992. A threshold for the protective effect of over-reinforced passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Behav Neural Biol.* **57**: 256-259.
- Davis HP, Spanis CW y Squire LR. 1976. Inhibition of cerebral protein synthesis: performance at different times after passive avoidance training. *Pharmacol Biochem Behav.* **4**: 13-16.
- Day TA, Overstreet DH y Schiller GD. 1977. Centrally administered cycloheximide in rats: behavioural concomitants and modulation of amnesic effects by biogenic amines. *Pharmacol Biochem Behav.* **6**: 557-565.
- DeZazzo J y Tully T. 1995. Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci.* **18**: 212-218.
- Diaz del Guante MA, Rivas-Arancibia S, Quirarte G y Prado-Alcalá RA. 1990. Over-reinforcement protects against memory deficits induced by muscarinic blockade of the striatum. *Bol Estud Med Biol.* **38**: 49-53.
- Duran-Arevalo M, Cruz-Morales SE y Prado-Alcalá RA. 1990. Is acetylcholine involved in memory consolidation of over-reinforced learning? *Brain Res Bull.* **24**: 725-727.
- Edwards DR y Mahadevan LC. 1992. Protein synthesis inhibitors differentially super induce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *Embo J.* **11**: 2415-2424.

- Ennis HL y Lubin M. 1964. Cycloheximide: Aspects of Inhibition of Protein Synthesis in Mammalian Cells. *Science*. **146**: 1474-1476.
- Ezzeddine Y y Glanzman DL. 2003. Prolonged habituation of the gill-withdrawal reflex in Aplysia depends on protein synthesis, protein phosphatase activity, and postsynaptic glutamate receptors. *J Neurosci*. **23**: 9585-9594.
- Flexner JB y Flexner LB. 1971. Pituitary peptides and the suppression of memory by puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **68**: 2519-2521.
- Flexner JB, Flexner LB, Hoffman PL y Walter R. 1977. Dose-response relationships in attenuation of puromycin-induced amnesia by neurohypophyseal peptides. *Brain Res*. **134**: 139-144.
- Flexner LB, Flexner JB y Stellar E. 1965. Memory and cerebral protein synthesis in mice as affected by graded amounts of puromycin. *Expl Neurology*. **13**: 264-272.
- Flexner LB y Flexner JB. 1966. Effect of acetoxycycloheximide and of an acetoxycycloheximide-puromycin mixture on cerebral protein synthesis and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **55**: 369-374.
- Flexner LB, Flexner JB y Roberts RB. 1966. Stages of memory in mice treated with acetoxycycloheximide before or immediately after learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **56**: 730-735.
- Flexner LB, Serota RG y Goodman RH. 1973. Cycloheximide and acetoxycycloheximide: inhibition of tyrosine hydroxylase activity and amnesic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **70**: 354-356.
- Flexner LB y Goodman RH. 1975. Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72**: 4660-4663.
- Flood JF, Bennett EL, Rosenzweig MR y Orme AE. 1972. Influence of training strength on amnesia induced by pretraining injections of cycloheximide. *Physiol Behav*. **9**: 589-600.
- Flood JF, Rosenzweig MR, Bennett EL y Orme AE. 1973. The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav*. **10**: 555-562.
- Flood JF, Bennett EL, Orme E y Rosenzweig MR. 1975a. Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis. *Physiol Behav*. **15**: 97-102.

- Flood JF, Bennett EL, Orme AE y Rosenzweig MR. 1975b. Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiol Behav.* **14**: 177-184.
- Flood JF, Jarvik ME, Bennett EL y Orme AE. 1976. Effects of ACTH peptide fragments on memory formation. *Pharmacol Biochem Behav.* **5**: 41-51.
- Flood JF, Jarvik ME, Bennett EL, Orme AE y Rosenzweig MR. 1977. The effect of stimulants, depressants, and protein synthesis- inhibition on retention. *Behav Biol.* **20**: 168-183.
- Flood JF, Bennett EL, Orme AE, Rosenzweig MR y Jarvik ME. 1978a. Memory: modification of anisomycin-induced amnesia by stimulants and depressants. *Science.* **199**: 324-326.
- Flood JF, Vidal D, Bennett EL, Orme AE, Vasquez S y Jarvik ME. 1978b. Memory facilitating and anti-amnesic effects of corticosteroids. *Pharmacol Biochem Behav.* **8**: 81-87.
- Flood JF, Smith GE y Jarvik ME. 1980. A comparison of the effects of localized brain administration of catecholamine and protein synthesis inhibitors on memory processing. *Brain Res.* **197**: 153-165.
- Flood JF, Smith GE, Bennett EL, Alberti MH, Orme AE y Jarvik ME. 1986. Neurochemical and behavioral effects of catecholamine and protein synthesis inhibitors in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* **24**: 631-645.
- Flood JF y Cherkin A. 1987. Fluoxetine enhances memory processing in mice. *Psychopharmacology (Berl).* **93**: 36-43.
- Flood JF, Cherkin A y Morley JE. 1987. Antagonism of endogenous opioids modulates memory processing. *Brain Res.* **422**: 218-234.
- Freedman LS, Judge ME y Quartermain D. 1982. Effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, on mouse brain catecholamine biochemistry. *Pharmacol Biochem Behav.* **17**: 187-191.
- Freeman FM, Rose SP y Scholey AB. 1995. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem.* **63**: 291-295.

- Fulton D, Kemenes I, Andrew RJ y Benjamin PR. 2005. A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci.* **21**: 1347-1358.
- Gibbs ME. 1976. Modulation of cycloheximide-resistant memory by sympathomimetic agents. *Pharmacol Biochem Behav.* **4**: 703-707.
- Gibbs ME y Ng KT. 1984. Dual action of cycloheximide on memory formation in day-old chicks. *Behav Brain Res.* **12**: 21-27.
- Giordano M y Prado-Alcalá RA. 1986. Retrograde amnesia induced by post-trial injection of atropine into the caudate-putamen. Protective effect of the negative reinforcer. *Pharmacol Biochem Behav.* **24**: 905-909.
- Govindarajan A, Rao BS, Nair D, Trinh M, Mawjee N, Tonegawa S, Chattarji S. 2006. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(35):13208-13.
- Guzowski JF. 2002. Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus.* **12**: 86-104.
- Hall ME, Schlesinger K y Stamm E. 1976. Prevention of memory loss following puromycin treatment. *Pharmacol Biochem Behav.* **4**: 353-355.
- Hazzalin CA, Le Panse R, Cano E y Mahadevan LC. 1998. Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction. *Mol Cell Biol.* **18**: 1844-1854.
- Hernandez PJ, Sadeghian K y Kelley AE. 2002. Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci.* **5**: 1327-1331.
- Hirata R, Togashi H, Matsumoto M, Yamaguchi T, Izumi T, Yoshioka M. 2008. Characterization of stress-induced suppression of long-term potentiation in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Brain Res.* **1226**:27-32.
- Hirata R, Matsumoto M, Judo C, Yamaguchi T, Izumi T, Yoshioka M, Togashi H. 2009. Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse.* **63**(7):549-556.

- Howland JG, Wang YT. 2008. Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in the hippocampus. *Prog Brain Res.* **169**:145-58
- Hughes PE, Alexi T y Dragunow M. 1997. Cycloheximide phase-shifts, but does not prevent, de novo Krox-24 protein expression. *Neuroreport.* **8**: 3263-3266.
- Hünnerkopf R, Strobel A, Gutknecht L, Brocke B, Lesch KP. 2007. Interaction between BDNF Val66Met and dopamine transporter gene variation influences anxiety-related traits. *Neuropsychopharmacology.* **32**(12):2552-60.
- Imanishi T, Sawa A, Ichimaru Y, Miyashiro M, Kato S, Yamamoto T y Ueki S. 1997. Ameliorating effects of rolipram on experimentally induced impairments of learning and memory in rodents. *Eur J Pharmacol.* **321**: 273-278.
- Isomae K, Morimoto S, Hasegawa H, Morita K y Kamei J. 2003. Effects of T-82, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on impaired learning and memory in passive avoidance task in rats. *Eur J Pharmacol.* **465**: 97-103.
- Itoh S, Takashima A y Maeda Y. 1992. Protective effect of cerulein on memory impairment induced by protein synthesis inhibitors in rats. *Peptides.* **13**: 1007-1012.
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S y Davis S. 2001. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci.* **4**: 289-296.
- Judge ME y Quartermain D. 1982. Alleviation of anisomycin-induced amnesia by pre-test treatment with lysine- vasopressin. *Pharmacol Biochem Behav.* **16**: 463-466.
- Kameyama T, Nabeshima T y Kozawa T. 1986. The antagonistic effects of naloxone on cycloheximide and anisomycin-induced amnesia. *Pharmacol Biochem Behav.* **25**: 567-572.
- Kang YJ, Seit-Nebi A, Davis RJ y Han J. 2006. Multiple activation mechanisms of p38alpha mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* **281**: 26225-26234.
- Kukushkin AN, Svetlikova SB y Pospelov VA. 2005. [Effect of anisomycin on activation of early response genes c-fos, c-jun, Egr-1 in cells transformed by E1A and cHa-ras oncogenes]. *Mol Biol (Mosk).* **39**: 80-88.
- Lu Y, Christian K, Lu B. 2008. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory?. *Neurobiol Learn Mem.* **89**(3):312-23.
- Mahadevan LC y Edwards DR. 1991. Signalling and superinduction. *Nature.* **349**: 747-748.

- Marmigere F, Givalois L, Rage F, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. 2003. Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus*. **13**(5):646-55.
- Martinez JL, Jr., Jensen RA y McGaugh JL. 1981. Attenuation of experimentally-induced amnesia. *Prog Neurobiol*. **16**: 155-186.
- Matsuo R, Hitomi T, Watanabe S y Kirino Y. 2002. Delayed-onset amnesia caused by protein synthesis inhibition in odor-taste associative memory of the terrestrial slug *Limax valentianus*. *Neurosci Lett*. **334**: 201-205.
- McGaugh JL, Roozendaal B. 2002. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol*. **12**:205-10
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrengruber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J y Brambilla R. 2002. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*. **34**: 807-820.
- Meiri N y Rosenblum K. 1998. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res*. **789**: 48-55.
- Milekic MH, Brown SD, Castellini C y Alberini CM. 2006. Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *J Neurosci*. **26**: 3010-3020.
- Nabeshima T, Maruyama E, Katoh A y Kameyama T. 1991. The effect of tacrine (THA) on cycloheximide- and basal forebrain lesion-induced memory deficit in rats. *Jpn J Pharmacol*. **57**: 311-319.
- Nakajima S. 1975. Amnesic effect of cycloheximide in the mouse mediated by adrenocortical hormones. *J Comp Physiol Psychol*. **88**: 378-385.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. **306**(5695):487-91.
- Parent MB, West M y McGaugh JL. 1994. Memory of rats with amygdala lesions induced 30 days after footshock-motivated escape training reflects degree of original training. *Behav Neurosci*. **108**: 1080-1087.

- Perez-Ruiz C y Prado-Alcalá RA. 1989. Retrograde amnesia induced by lidocaine injection into the striatum: Protective effect of the negative reinforcer. *Brain Res Bulletin*. **22**: 599-603.
- Poschel B y Manahan-Vaughan D. 2007. Persistent (>24h) long-term depression in the dentate gyrus of freely moving rats is not dependent on activation of NMDA receptors, L-type voltage-gated calcium channels or protein synthesis. *Neuropharmacology*. **52**: 46-54. Epub 2006 Aug 2008.
- Prado-Alcalá RA, Kaufmann P y Moscona R. 1980. Scopolamine and KCl injections into the caudate nucleus. Overtraining-induced protection against deficits of learning. *Pharmacol Biochem Behav*. **12**: 249-253.
- Prado-Alcalá RA. 1991. Fisiología del aprendizaje y la memoria. En G. Ninomiya (Ed.), *Fisiología Humana. I. Neurofisiología*. (pp. 442-508). México: El Manual Moderno.
- Prado-Alcalá RA y Quirarte GL. 1993. La conducta y la mente. En "Información Científica y Tecnológica. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.", Vol. 15.
- Prado-Alcalá RA y Quirarte GL. 1998. De la memoria y el cerebro. En R. De la Fuente y F.J. Alvarez-Leefmans (Eds.), *Biología de la mente*. (pp. 245-256). México.: Fondo de Cultura Económica.
- Quartermain D y McEwen BS. 1970. Temporal Characteristics of Amnesia induced by Protein Synthesis Inhibitor: Determination by Shock Level. *Nature*., **228**: 677-678.
- Quartermain D, McEwen BS y Azmitia EC, Jr. 1970. Amnesia produced by electroconvulsive shock or cycloheximide: conditions for recovery. *Science*. **169**: 683-686.
- Quartermain D, Freedman LS, Botwinick CY y Gutwein BM. 1977. Reversal of cycloheximide-induced amnesia by adrenergic receptor stimulation. *Pharmacol Biochem Behav*. **7**: 259-267.
- Quevedo J, Vianna MR, Roesler R, de-Paris F, Izquierdo I, Rose SP. 1999. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem*. **6**:600-7

- Quinton EE y Kramarcy NR. 1977. Memory impairment correlates closely with cycloheximide dose and degree of inhibition of protein synthesis. *Brain Res.* **131**: 184-190.
- Quiroz C, Martinez I, Quirarte GL, Morales T, Diaz-Cintra S y Prado-Alcalá RA. 2003. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Exp Brain Res.* **153**: 400-402.
- Rainbow TC, Hoffman PL y Flexner LB. 1980. Studies of memory: a reevaluation in mice of the effects of inhibitors on the rate of synthesis of cerebral proteins as related to amnesia. *Pharmacol Biochem Behav.* **12**: 79-84.
- Roberts RB, Flexner JB y Flexner LB. 1970. Some evidence for the involvement of adrenergic sites in the memory trace. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **66**: 310-313.
- Roosendaal B, Quirarte GL, McGaugh JL. 1997. Stress-activated hormonal systems and the regulation of memory storage. *Ann N Y Acad Sci.* **821**:247-58
- Rosenzweig MR. 1996. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu Rev Psychol.* **47**: 1-32.
- Routtenberg A y Rekart JL. 2005. Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends Neurosci.* **28**: 12-19.
- Sandi C y Rose SP. 1994. Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm. *Brain Res.* **647**: 106-112.
- Schafe GE y LeDoux JE. 2000. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci.* **20**: RC96.
- Schweri MM y Carr LA. 1982. Effects of amino acid alterations caused by protein synthesis inhibitors on brain monoamine formation. *Neuropharmacology.* **21**: 839-845.
- Serota RG. 1971. Acetoxycycloheximide and transient amnesia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **68**: 1249-1250.
- Serota RG, Roberts RB y Flexner LB. 1972. Acetoxycycloheximide-induced transient amnesia: protective effects of adrenergic stimulants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**: 340-342.

- Sershen H, Reith ME y Lajtha A. 1982. On the interaction between nicotine and cycloheximide. *Brain Res.* **251**: 183-185.
- Shin SY, Lee JH, Min B y Lee YH. 2006. The translation inhibitor anisomycin induces Elk-1-mediated transcriptional activation of egr-1 through multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Exp Mol Med.* **38**: 677-685.
- Solana-Figueroa R, Salado-Castillo R, Quirarte GL, Galindo LE y Prado-Alcalá RA. 2002. Enhanced inhibitory avoidance training protects against the amnesic effect of p-chloroamphetamine. *Life Sci.* **71**: 391-399.
- Spanis CW y Squire LR. 1978. Elevation of brain tyrosine by inhibitors of protein synthesis is not responsible for their amnesic effect. *Brain Res.* **139**: 384-388.
- Squire LR y Barondes SH. 1972. Variable decay of memory and its recovery in cycloheximide-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**: 1416-1420.
- Squire LR y Barondes SH. 1973. Memory impairment during prolonged training in mice given inhibitors of cerebral protein synthesis. *Brain Res.* **56**: 215-225.
- Squire LR, Kuczenski R y Barondes SH. 1974. Tyrosine hydroxylase inhibition by cycloheximide and anisomycin is not responsible for their amnesic effect. *Brain Res.* **82**: 241-248.
- Squire LR, Davis HP y Spanis CW. 1980. Neurobiology of amnesia. *Science.* **209**: 836-837.
- Squire LR. 1987. *Memory and Brain.* New York: Oxford University Press.
- Stettner LJ, Barraco R y Normile HJ. 1977. Effect of antibiotics on retention of visual discrimination training and on protein synthesis in the pigeon. *Physiol Behav.* **19**: 145-154.
- Torocsik B y Szeberenyi J. 2000. Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *Eur J Neurosci.* **12**: 527-532.
- Tucker AR, Gibbs ME y Stanes MD. 1976. Cycloheximide and passive avoidance memory in mice: time-response, dose-response and short-term memory. *Pharmacol Biochem Behav.* **4**: 441-446.

- Wanisch K, Wotjak CT. 2008. Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem.* **90**(3):485-94.
- Watanabe H, Takaya T, Shimoi T, Ogawa H, Kitamura Y y Oka K. 2005. Influence of mRNA and protein synthesis inhibitors on the long-term memory acquisition of classically conditioned earthworms. *Neurobiol Learn Mem.* **83**: 151-157.
- Wustenberg D, Gerber B y Menzel R. 1998. Short communication: long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur J Neurosci.* **10**: 2742-2745.
- Xiong W, Kojic LZ, Zhang L, Prasad SS, Douglas R, Wang Y, Cynader MS. 2006. Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res.* **1085**:68-76
- Yarmolinsky MB y Haba GL. 1959. Inhibition by Puromycin of Amino Acid Incorporation into Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **45**: 1721-1729.
- Yarom O, Maroun M, Richter-Levin G. 2008. Exposure to forced swim stress alters local circuit activity and plasticity in the dentate gyrus of the hippocampus. *Neural Plast.*; **2008**:194097.
- Zinck R, Cahill MA, Kracht M, Sachsenmaier C, Hipskind RA y Nordheim A. 1995. Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Mol Cell Biol.* **15**: 4930-4938.