



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**MECANISMOS MOLECULARES EN LA
FORMACIÓN DE LA MEMORIA DE
RECONOCIMIENTO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ARIANA ISRAELA BALDERAS MORENO

DIRECTOR DE TESIS: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI

MÉXICO, D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Fue dirigido por el Dr. Federico Bermúdez Rattoni; con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 60478 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN216709.

Agradezco infinitamente al Dr. Federico Bermúdez Rattoni por ser mi guía en el mundo de la ciencia, por toda su confianza y paciencia; por sus invaluable consejos y por permitirme ser su alumna.

Quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial, a la Dra. Martha Escobar Rodríguez y al Dr. Víctor Ramírez Amaya por sus valiosos comentarios y por la revisión que hicieron a este trabajo. Asimismo, quiero agradecer a los Doctores Miguel Pérez de la Mora, Gabriel Roldán, Oscar Prospero, y Ranier Gutiérrez por la revisión de esta tesis.

Al Dr. Carlos Rodríguez Ortiz, por toda su ayuda y comentarios a este proyecto.

A Perla Moreno Castilla por su ayuda en el laboratorio y a Jean-Pascal Morin, por su apoyo incondicional.

A Oreste Carbajal y Patricia Delgado por todo su apoyo ¡Muchísimas gracias!

Finalmente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha brindado la oportunidad de cumplir mis sueños.

DEDICATORIA

A mis papás Paula y Daniel, porque gracias ustedes se lo que es el amor, y porque este logro mío, es absolutamente suyo.

A mis hermanas Dany, Pau, y Mar, las compañeras de mi vida!

A mis nuevos hermanos Paul y Rigo.

A Sebastián, Julieta, Rebeca y Emilio, que me tomaron con sus pequeñas manitas y me obligaron a maravillarme una vez más del cielo; porque junto a ellos, lo tengo todo.

A toda mi familia, que es tan grande que no acabaría; gracias por todo su apoyo.

A mis amigos, que han estado junto a mí en todo momento:

Jimena, Diana, Denise, Claudio, Aleph, Nico, Israel, Rodrigo, Chey, Pascal,
Marlen, Alondra, Miriam, Roberto, Perla y Daniel.

Un hombre de un pueblo de Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo.

A la vuelta, contó. Dijo que había contemplado, desde allá arriba, la vida humana. Y dijo que somos un mar de fueguitos.

– El mundo es eso – reveló – . Un montón de gente, un mar de fueguitos.

Cada Persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.

Eduardo Galeano

A Vanesa

un fueguito que todo lo incendió.

Abreviaturas

ACSF	Líquido cefalorraquídeo artificial
ANI	Anisomicina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BLA	Amígdala basolateral
CI	Corteza insular
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HIP	Hipocampo
MCP	Memoria a corto plazo
MLP	Memoria a largo plazo
MUSC	Muscimol
PRH	Corteza perirrinal
VEH	Vehículo

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Antecedentes	3
Objetivo	9
Hipótesis	9
Inhibición de la síntesis de proteínas	9
Resultados	12
Experimentos de reconocimiento de objetos	12
Experimentos de reconocimiento de objetos en contexto	15
Conclusiones	19
Evocación y actualización de la memoria (antecedentes)	20
Objetivo	27
Hipótesis	27
Resultados	30
Experimentos de reconsolidación de la memoria	30
Experimentos de actualización de la memoria	34
Conclusiones	37
Discusión	38
Materiales y Métodos	47
Sujetos	47
Cirugía y microinyección	47
Fármacos	48
Aparatos experimentales	49
Procedimiento conductual	50
Tarea de reconocimiento de objetos	50
Tarea de reconocimiento de objetos en contexto	51
Protocolo de reconsolidación y de actualización de la memoria	52
Análisis estadístico	53
Histología	53
Referencias	55
Apéndice	60

Publicación derivada de este proyecto

RESUMEN

La información recientemente adquirida es susceptible de olvidarse; sin embargo, si la información se consolida mediante la síntesis de proteínas se puede mantener en un estado más estable a largo plazo. En la primera parte de este trabajo se investigó el papel de varias regiones del lóbulo temporal en la consolidación de la memoria de reconocimiento. Se realizaron inyecciones de anisomicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, en las cortezas perirrinal e insular, en el hipocampo dorsal y la amígdala basolateral, inmediatamente después de la adquisición en las tareas de reconocimiento de objetos y reconocimiento de objetos en contexto. Los resultados muestran que las cortezas insular y perirrinal son indispensables para la consolidación de la memoria de reconocimiento para estímulos individuales (tarea de reconocimiento de objetos), mientras que el hipocampo es indispensable para la consolidación de la memoria de estímulos dentro de un contexto específico (tarea de reconocimiento de objetos en contexto); la amígdala no parece tener ninguna participación en la consolidación de estas dos tareas. Estos resultados muestran claramente que las distintas regiones del lóbulo temporal tienen una participación diferencial en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos y de objetos en contexto.

Se ha propuesto que las memorias previamente consolidadas pueden volver a un estado lábil cuando se evocan, y que mediante un proceso que se ha llamado reconsolidación, el cual requiere de síntesis de proteínas, esta memoria que ha sido evocada se estabiliza a largo plazo. En la segunda parte de este proyecto evaluamos si la corteza perirrinal participa en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento y si la evocación es indispensable para iniciar la reconsolidación. Realizamos inyecciones en la corteza perirrinal de anisomicina y/o muscimol (agonista de los receptores GABA_A), un fármaco que se ha visto bloquea la expresión conductual de la evocación. Los resultados muestran que en ausencia de la evocación conductual explícita, la inhibición de síntesis de proteínas daña la re-estabilización de la memoria. Sin embargo, la memoria puede ser reconsolidada y actualizada aún en ausencia de la evocación conductual explícita. Estos resultados dan evidencia de que la evocación no es necesaria para que ocurra la reconsolidación como lo sugiere la teoría actual .

ABSTRACT

Recently acquired information is susceptible to forgetting. However when the new information is consolidated via synthesis of new proteins it becomes long-term stored memories. In the first part of this project we investigated the involvement of several temporal lobe regions in consolidation of recognition memory. Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, was infused into the hippocampus, perirhinal cortex, insular cortex or basolateral amygdala of rats immediately after the sample phase of object or object-in-context recognition memory training. Anisomycin infused into perirhinal or insular cortices blocked long-term (24 hours), but not short-term (90 minutes) object recognition memory. Infusions into the hippocampus or amygdala did not impair object recognition memory. Anisomycin infusion into the hippocampus blocked long-term, but not short-term object-in-context recognition memory. Infusions administered into the perirhinal cortex, insular cortex or amygdala did not affect object-in-context recognition memory. Whereas perirhinal and insular cortices are required for consolidating familiar objects, the hippocampus is necessary for consolidating contextual information of recognition memory. Altogether, these results suggest that temporal lobe structures are differentially involved in recognition memory consolidation.

It has been suggested that previously consolidated memories could return to a labile state after retrieval and undergo once more a consolidation process through new protein synthesis in order to be maintained in long-term, this process is referred as reconsolidation. In the second part of this project we evaluated whether perirhinal cortex participates in object recognition memory reconsolidation and whether retrieval is indispensable to trigger memory reconsolidation. To do so, we injected the protein synthesis inhibitor anisomycin together with a retrieval blocker muscimol (agonist GABA_A) in the rat brain. Muscimol injection specifically disrupted retrieval of recognition memory. We found that in the absence of behavioral retrieval protein synthesis inhibition impaired memory re-stabilization. Therefore stored memory suffers reconsolidation even though memory is not recalled. This result provides evidence of molecular dissociation between retrieval and activation of memory.

ANTECEDENTES

(PRIMERA PARTE DEL PROYECTO)

Una de las principales características de algunos síndromes amnésicos relacionados a lesiones o enfermedades neurodegenerativas (como la de Alzheimer) es la pérdida de la memoria de reconocimiento. La memoria de reconocimiento es la habilidad para discriminar la familiaridad de las cosas previamente experimentadas (Mandler, 1980; Brown and Aggleton, 2001). Se ha propuesto que este proceso de reconocimiento está compuesto de al menos dos componentes funcionales, uno de los cuales está basado en el **reconocimiento** de la familiaridad de los estímulos. El otro componente está basado en el **recuerdo** de la información espacio-temporal (contextual) de los eventos (Mandler, 1980) y se ha propuesto que las distintas regiones del lóbulo temporal medial contribuyen de manera diferente en la memoria de reconocimiento (Graham and Gaffan, 2005; Murray et al., 2005). El nivel de familiaridad de un estímulo juega un papel muy importante en el procesamiento de la memoria; los eventos novedosos atraen más nuestra atención que los eventos familiares; además, la habilidad para responder rápidamente a los eventos novedosos es fundamental para la supervivencia. (Ennaceur and Delacour, 1988) desarrollaron la tarea de reconocimiento de objetos basados en la tendencia natural de los roedores a explorar más los objetos novedosos que los familiares. Normalmente, en esta tarea se presentan dos objetos novedosos idénticos para que la rata se familiarice con ellos y después de un intervalo de tiempo, en una segunda fase, se le presentan un objeto familiar (presentado en la primera fase) y un objeto novedoso. Si una rata explora preferentemente el objeto novedoso,

necesariamente tiene que recordar cual de los objetos ha explorado previamente. Se ha propuesto que esta tarea mantiene una cercana analogía con las pruebas de reconocimiento que son usadas en los humanos para evaluar la memoria de reconocimiento (que incluyen material verbal: palabras, nombres, frases, historias y material no verbal: objetos, fotografías y patrones de líneas y puntos). Por ejemplo, la tarea de reconocimiento de objetos en humanos consiste en la presentación de una serie de objetos en una primera fase, y después de cierto intervalo de tiempo se realiza una prueba de discriminación entre un objeto presentado en la primera fase (objeto familiar) y un objeto nuevo, donde la persona tiene que responder cuál es el familiar. Estas pruebas han sido utilizadas para caracterizar los síndromes amnésicos ya que proveen un índice de la severidad del daño de la memoria explícita (Reed and Squire, 1997).

Existe una distinción entre dos tipos de memoria de largo plazo: la memoria explícita y la memoria implícita. La memoria explícita es aquella en la que se almacena el conocimiento de hechos y eventos; este tipo de memoria es fácil de consolidar, pero también es fácil olvidarla. La memoria implícita es la memoria para las habilidades; para formar este tipo de memoria es necesaria la repetición y la práctica, y una vez consolidada es menos probable que se olvide (Squire and Zola, 1996).

La hipótesis de la consolidación de la memoria planteada por Muller y Pilzecker en 1900 propone que la información recientemente adquirida se encuentra en un estado lábil y que con el tiempo se consolida para

mantenerse en un estado estable y a largo plazo (McGaugh, 2000). Este proceso de consolidación de nueva información se sabe requiere de síntesis de proteínas (Davis et al., 1980). El proceso de consolidación que ocurre después de la adquisición de la información, desencadena una serie de eventos moleculares; entre los que se incluyen, la activación de reguladores transcripcionales a través de cascadas de segundos mensajeros, diferentes períodos de expresión de ARNm y síntesis de proteínas. Algunas de estas proteínas producen cambios funcionales en las neuronas y en las sinapsis, mientras que otras llevan a cambios estructurales (Lechner et al., 1999).

En 1957 Brenda Milner y William Scoville describieron uno de los hechos más relevantes para el estudio de la neurofisiología de la memoria, el caso de un paciente llamado H.M. Este paciente sufría de una epilepsia intratable del lóbulo temporal, por lo que sus médicos decidieron practicarle una ablación del lóbulo temporal medial. Entre las estructuras que se encuentran en dicho lóbulo están la formación hipocampal, la amígdala y regiones corticales como las cortezas entorrinal, perirrinal, y parahipocampal. Después de la cirugía, las crisis epilépticas de H.M. disminuyeron, pero la operación también disminuyó la capacidad mnemónica del paciente, a pesar de que su coeficiente intelectual se mantuvo normal. Aunque H.M. tenía casi intactos sus recuerdos más remotos, su capacidad para formar nuevos recuerdos estaba severamente dañada (Milner et al., 1998) . La memoria implícita de H.M. estaba intacta, mientras que su memoria explícita estaba seriamente afectada. Por ejemplo, era incapaz de recordar a las personas que acababa de conocer o si dejaba de prestar atención a las cosas que estaba haciendo,

rápidamente se olvidaba de ellas. Un punto importante a señalar del caso del paciente H.M. es que podía hacer uso de su memoria de corto y de largo plazo. Su verdadero problema radicaba en que no podía consolidar la nueva información (ver Bermúdez-Rattoni, y Prado-Alcalá 2001).

A partir de la descripción del caso H.M., algunos investigadores se dieron a la tarea de realizar modelos experimentales con animales que pudieran replicar la lesión de este paciente y además se interesaron por lesionar selectivamente las estructuras del lóbulo temporal para medir sus efectos sobre la memoria (Murray and Mishkin, 1986, 1998). El hipocampo es una de las estructuras dentro del lóbulo temporal que más atención ha recibido, debido a que reportes clínicos han vinculado las lesiones del hipocampo con una pérdida de la capacidad mnemónica explícita (Brown and Aggleton, 2001).

Los primeros estudios de amnesia producida por ablaciones del lóbulo temporal medial en monos sugerían que las lesiones combinadas del hipocampo y la amígdala eran las responsables del daño tan severo observado en la memoria de reconocimiento (Mishkin, 1978). Sin embargo, se ha demostrado que el daño observado en la memoria de reconocimiento no está directamente relacionado a la lesión del hipocampo y la amígdala, sino más bien, a la lesión de las porciones anterior y posterior de las cortezas perirrinal y entorrinal inducida por la aspiración del hipocampo y la amígdala (Murray and Mishkin, 1998).

La contribución de las distintas regiones del lóbulo temporal al procesamiento de la información de familiaridad y de contexto en la memoria de reconocimiento, permanece como un tema de considerable controversia. En este sentido existe evidencia de estudios con animales que sugieren que la corteza perirrinal y el hipocampo contribuyen diferencialmente a estos dos componentes de la memoria de reconocimiento. Los hallazgos de diversos estudios sugieren que la corteza perirrinal está críticamente involucrada en la discriminación de la familiaridad, pero no en la memoria contextual; mientras que el hipocampo es importante para la memoria de reconocimiento cuando ésta involucra información que tiene un componente asociativo o espacial y parece no ser necesario para la discriminación de la familiaridad (Ennaceur et al., 1996; Ennaceur and Aggleton, 1997; Bussey et al., 1999; Mumby et al., 2002; Stupien et al., 2003; Winters et al., 2004; Mumby et al., 2005). Sin embargo, como algunos estudios sugieren que el hipocampo está involucrado en la memoria de reconocimiento de objetos que es una tarea basada en la discriminación de la familiaridad de los estímulos, el papel de dicha estructura en la memoria de reconocimiento aún permanece en controversia (Broadbent et al., 2004; Rossato et al., 2007; Squire et al., 2007). La participación de la amígdala en la memoria de reconocimiento también ha sido controvertida. Algunos autores han encontrado que la capacidad para discriminar objetos novedosos está afectada en ratas después de lesionar la amígdala con NMDA, mientras otros estudios muestran que dicha estructura no es crítica para la memoria de reconocimiento (Mumby and Pinel, 1994).

A pesar del esfuerzo por dilucidar cual es la contribución de las diferentes estructuras del lóbulo temporal en la memoria de reconocimiento, no hay evidencia clara de que estas estructuras sean necesarias para la consolidación. Aunque los estudios donde se realizan lesiones proporcionan información importante, estos no permiten discernir el papel que tienen las estructuras en las diferentes etapas de la formación de la memoria (adquisición, consolidación, evocación y reconsolidación).

Estudios recientes indican que la corteza insular es también una estructura del lóbulo temporal involucrada importantemente en la consolidación de la memoria de reconocimiento. Se ha reportado que la inyección en la corteza insular de escopolamina que es un antagonista de los receptores muscarínicos afecta la memoria de reconocimiento para estímulos gustativos (Bermudez-Rattoni, 2004) y recientemente se ha demostrado que también afecta la tarea de reconocimiento de objetos (Bermudez-Rattoni, 2004; Bermudez-Rattoni et al., 2005). Estos estudios sugieren que la corteza insular podría formar parte del sistema de memoria del lóbulo temporal, así como tener una participación importante en las fases iniciales de la consolidación de la memoria en una tarea de reconocimiento.

OBJETIVO

La primera parte de este proyecto de investigación tuvo como objetivo, analizar la participación de las cortezas perirrinal e insular, así como el hipocampo dorsal y la amígdala basolateral, en la consolidación de la memoria en la tarea de reconocimiento de objetos y de objetos en contexto.

HIPOTESIS

Las estructuras del lóbulo temporal tienen una participación diferencial en la consolidación de la memoria de reconocimiento dependiendo cual sea la información relevante a consolidar (ej. familiaridad de los estímulos o el contexto donde se experimentaron).

INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS

Se ha reportado que para que ocurra la consolidación de la información se requiere de la síntesis de proteínas, por lo que una estrategia experimental para bloquear la consolidación es impedir dicha síntesis (Davis and Squire, 1984). Entre las drogas más frecuentemente utilizadas para inhibir la síntesis de proteínas se encuentra el antibiótico anisomicina ($C_{14}H_{19}O_4N$) aislado de *Streptomyces griseolus*. Este fármaco bloquea reversiblemente la síntesis de proteínas (Davis and Squire, 1984), a través de la inhibición de la traducción de ARNm, que interrumpe la reacción de la peptidil transferasa (Iordanov et al., 1997), ver figura 1.

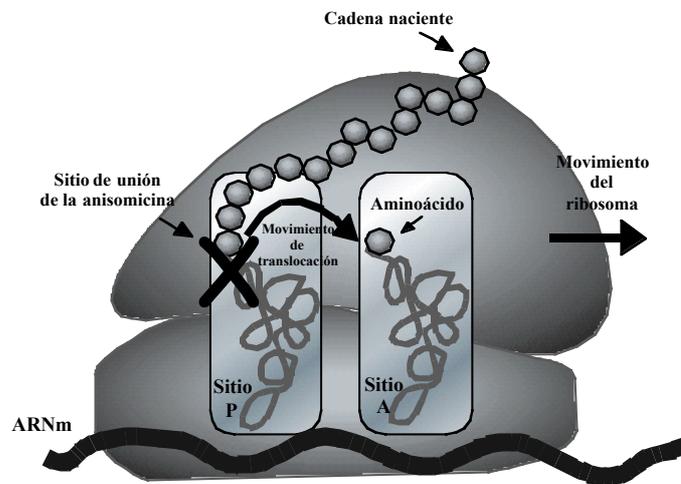


Figura 1. El antibiótico anisomicina interrumpe la elongación del polipéptido. La anisomicina se une al Sitio P del ribosoma e inhibe la reacción de la peptidiltransferasa. El sitio de unión de la anisomicina en el ribosoma está localizado en la región 28S rARN, de la subunidad 60S del ribosoma.

Se administró anisomicina en la corteza insular, en la corteza perirrinal, en el hipocampo dorsal o en la amígdala basolateral inmediatamente después del entrenamiento (fase de muestra) de las tareas de reconocimiento de objetos, o de objetos en contexto. Se realizó una prueba de memoria 90 minutos (memoria de corto plazo, MCP) o 24 horas (memoria de largo plazo, MLP) después del entrenamiento. En todos los experimentos se utilizaron grupos independientes.

EVOCAION Y ACTUALIZACION DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO

ANTECEDENTES

(SEGUNDA PARTE DEL PROYECTO)

Como se mencionó anteriormente, la hipótesis de la consolidación de la memoria propone que la información recientemente adquirida se encuentra en un estado lábil y que con el tiempo se consolida para mantenerse en un estado estable y a largo plazo (McGaugh, 2000), y que este proceso de consolidación requiere de síntesis de proteínas (Davis et al., 1980). Aunque en un principio se pensó que la información recientemente adquirida no podía ser alterada después de ser consolidada, estudios posteriores mostraron que las memorias previamente consolidadas pueden atravesar por un proceso similar a la consolidación, al que se le ha llamado reconsolidación (Nader et al., 2000a).

Misanin y colaboradores en 1968, mostraron que la aplicación de choques electroconvulsivos en ratas inmediatamente después de la adquisición de un condicionamiento al miedo afectaba la consolidación de la memoria. En ese estudio, otro grupo de ratas entrenadas en el mismo condicionamiento se sometieron a un choque electroconvulsivo inmediatamente después de evocar la memoria (un día después de la adquisición) sólo con el estímulo condicionado; lo que observaron estos investigadores fue que los animales tenían afectada la memoria cuando se probaron 24 horas después de la evocación. El grupo control fundamental en ese experimento fue el que recibió el choque electroconvulsivo 24 horas después del condicionamiento,

pero en ausencia de la prueba de evocación (sin presentar el estímulo condicionado). Los autores demostraron que los choques electroconvulsivos no tuvieron efecto sobre la memoria cuando ésta no fue evocada. A este fenómeno le llamaron amnesia dependiente de una clave (Misanin et al., 1968). A partir del trabajo de Misanin se sugirió que la reactivación de la memoria previamente consolidada a través de la evocación explícita (ejecución conductual), provocaba que este trazo de memoria fuera vulnerable una vez más a los agentes amnésicos (Bevilaqua et al., 2008).

Siguiendo el trabajo de Misanin y colaboradores, otros grupos mostraron que las memorias previamente consolidadas atraviesan por un estado de labilidad sólo si éstas son reactivadas a través de la evocación. Por ejemplo, la inactivación del núcleo parabraqueal con TTX afecta la memoria previamente consolidada para la tarea de prevención pasiva cuando esta es evocada con uno de los estímulos asociados (sólo con la exposición al contexto); cuando se inactiva el núcleo parabraqueal pero la memoria no es evocada esta se mantiene intacta (Bucherelli and Tassoni, 1992). Asimismo, el grupo de Susan Sara demostró que la aplicación intraperitoneal del fármaco MK-801 que es un antagonista de los receptores NMDA (que bloquea la consolidación cuando se administra después de la adquisición) provoca un déficit en la memoria de una tarea espacial, cuando ésta es reactivada mediante la evocación (Przybylski and Sara, 1997).

Nader y colaboradores (2000), demostraron que el bloqueo de la síntesis de proteínas después de la evocación de una memoria aversiva, impedía que se

llevara a cabo la reconsolidación, efecto que se veía reflejado en el deterioro de esa memoria. En ese estudio se administró anisomicina en la amígdala que es uno de los núcleos que se sabe participa en la consolidación del condicionamiento al miedo. Se apareó un tono con un choque eléctrico lo cual provoca una respuesta de congelamiento en la rata. Veinticuatro horas después del condicionamiento se evocó la memoria sólo con la presentación del tono e inmediatamente después se administró la anisomicina; la memoria fue probada 24 horas después. Los resultados mostraron que la anisomicina administrada después de la evocación afectaba la memoria previamente consolidada. Es importante mencionar que este efecto sólo se veía si la memoria era evocada ya que si se administraba la anisomicina 24 horas después del condicionamiento pero sin evocar la memoria (sin presentar el tono) la memoria permanecía intacta al probarla 24 horas después.

La importancia del trabajo de Nader es que por primera vez se demostró la dependencia de síntesis de proteínas para la reconsolidación; además de que en este estudio se observó que existía una ventana temporal en la cual se podía afectar la reconsolidación, al igual que en la consolidación y que el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en la reconsolidación sólo ocurre cuando se evoca la memoria. Después del reporte de Nader et al. (2000) se han realizado diversos estudios donde se demuestra que diversas manipulaciones farmacológicas (incluyendo la inhibición de síntesis de proteínas) después de evocar una memoria previamente consolidada bloquean la reconsolidación. Cabe mencionar que estos estudios se han realizado en diversas estructuras y con diferentes tareas conductuales

incluyendo memorias no aversivas, tales como tareas de reconocimiento de objetos, reconocimiento social y aprendizaje espacial (Sara, 2000; Akirav and Maroun, 2006; Perrin et al., 2007; Rossato et al., 2007; Da Silva et al., 2008; Lima et al., 2009; Maroun and Akirav, 2009).

Se ha propuesto que las memorias previamente consolidadas pueden volver a un estado lábil cuando son reactivadas a través de la evocación explícita, requiriendo una vez más de síntesis de proteínas para volver a ser estabilizadas y de esta manera mantenerse en el largo plazo (Nader et al., 2000a; Nader et al., 2000b; Tronson and Taylor, 2007).

Una pregunta que surgió junto con los estudios de reconsolidación de la memoria fue ¿cuál es el significado biológico de la reconsolidación? Una de las primeras hipótesis fue que la evocación y la reconsolidación podrían servir para actualizar y reforzar un trazo de memoria que es dinámico y que las memorias más frecuentemente evocadas serían más difíciles de ser olvidadas (Sara, 2000).

En este contexto, un trabajo realizado en nuestro laboratorio sugiere que el proceso de reconsolidación podría servir para incorporar información relevante al trazo de memoria previamente consolidado, para que sea actualizado. En este trabajo se administró anisomicina en la corteza insular después de evocar la memoria previamente consolidada en una tarea de reconocimiento gustativo y se observó que la memoria sólo se veía afectada cuando había información relevante que integrar al trazo de memoria. En este

estudio se concluyó que la reconsolidación permite la consolidación de información actualizada, cuando la memoria es evocada (Rodríguez-Ortiz et al., 2005).

En un estudio realizado por el grupo de Izquierdo y colaboradores, se demostró la dependencia de síntesis de proteínas en el hipocampo para que se lleve a cabo la reconsolidación en la tarea de reconocimiento de objetos. En dicho estudio se administró anisomicina en el hipocampo después de la reactivación de la memoria, en presencia de dos objetos familiares y observaron que la memoria de reconocimiento previamente consolidada no se afectaba. Sin embargo, la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo después de reactivar la memoria con un objeto familiar y uno novedoso dañaba la memoria para ambos objetos; sugiriendo que la reconsolidación ocurre cuando se agrega nueva información al trazo original de memoria de reconocimiento. Además demostraron que la memoria consolidada no se afectaba si la administración de la anisomicina se hacía sin evocar la memoria, demostrando, una vez más, que la evocación de la memoria es necesaria para que ocurra la reconsolidación (Rossato et al., 2007).

Los resultados de la primera parte de este trabajo mostraron que la síntesis de proteínas en la corteza perirrinal es necesaria para que ocurra la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos; sin embargo, el papel de la corteza perirrinal en la reconsolidación de la memoria no ha sido evaluado. Por lo tanto, en la siguiente parte de este proyecto evaluamos la

participación de la corteza perirrinal en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos.

Aunque es ampliamente aceptado que para que ocurra la reconsolidación se requiere de la reactivación de la memoria, a través de la evocación explícita (ejecución conductual), no hay evidencia suficiente en la literatura que sugiera que esto sea un requisito indispensable, por lo que surge la pregunta ¿se necesita realmente de la evocación para que ocurra la reconsolidación de la memoria?

El grupo de Karim Nader realizó un experimento en donde bloquearon los receptores AMPA con un antagonista (CNQX) en la amígdala basolateral y observaron que esta manipulación farmacológica impedía la expresión de la respuesta condicionada (evocación explícita) en una tarea de condicionamiento al miedo; sin embargo, no afectaba la adquisición, ni la reconsolidación la memoria. De esta manera, se sugiere que los receptores AMPA son necesarios para la expresión de una respuesta condicionada durante la evocación, pero que no son necesarios para que ocurra la reconsolidación (Ben Mamou et al., 2006).

Asimismo, resultados recientes de nuestro laboratorio muestran que la administración de un antagonista de los receptores AMPA (NBQX) en la amígdala basolateral impide la expresión conductual de la evocación en una memoria gustativa; no obstante, este bloqueo de los receptores AMPA no afecta la adquisición, la consolidación, ni reconsolidación de dicha memoria.

Este efecto no parece ser exclusivo del bloqueo de los receptores AMPA, ya que se ha reportado que el muscimol que es un agonista de los receptores GABA_A también bloquea la expresión de la evocación conductual de la memoria. Este efecto en la evocación ha sido observado en diferentes tareas conductuales como el condicionamiento al miedo en contexto, en la prevención pasiva y en el laberinto de agua. Un dato que es importante resaltar es que el efecto tanto del muscimol como del NBQX parece ser sólo sobre la evocación, sin que se afecte la adquisición, la consolidación, ni la reconsolidación de la memoria. (Moser and Moser, 1998; Holt and Maren, 1999; Corcoran and Maren, 2001; Izquierdo et al., 2007).

Asimismo, el efecto sobre la evocación de la memoria ha sido observado después de la inactivación temporal de diversas áreas cerebrales, como la amígdala, el hipocampo, en núcleo parabraqueal, las cortezas, prefrontal y perirrinal (Bucherelli and Tassoni, 1992; Holt and Maren, 1999; Ben Mamou et al., 2006; Ramos, 2008).

OBJETIVO

En la siguiente parte de este proyecto se evaluó si la corteza perirrinal participa en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. También se analizó el papel que tiene la evocación en la reconsolidación y en la consolidación de nueva información asociada a un trazo de memoria previó (actualización de la memoria) en la tarea de reconocimiento de objetos.

Se realizaron manipulaciones farmacológicas en la corteza perirrinal para afectar diferencialmente la evocación (mediante la inactivación de esta corteza con la inyección de muscimol), de la consolidación y reconsolidación de la memoria (mediante inyecciones de anisomicina).

HIPOTESIS

1. La reconsolidación de la memoria de reconocimiento requiere de síntesis de proteínas en la corteza perirrinal.
2. El bloqueo de la evocación, no afectará la reconsolidación de la memoria, en la tarea de reconocimiento de objetos.
3. El bloqueo de la evocación, no afectará la actualización de la memoria en la tarea de reconocimiento de objetos.

MATERIALES Y METODOS

SUJETOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 280-300 g de peso, obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular. Los animales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico en un ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, con agua y comida *ad libitum*. Los experimentos se realizaron durante la fase de luz.

CIRUGIA Y MICROINYECCION

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (83 mg/kg) y xilacina (9 mg/kg) i.p., e implantadas con cánulas bilaterales en la zona cerebral de interés, mediante cirugía estereotáxica. Las coordenadas de los sitios de infusión se mencionan a continuación con referencia en bregma (Paxinos, 1986): **corteza insular** (CI) anteroposterior (AP) + 1.2 mm, lateral (L) \pm 5.5 mm, dorsoventral (DV) -6.5 mm; **corteza perirrinal** (Prh): AP - 3 mm, L \pm 6.5 mm, DV - 7 mm; **hipocampo** (HIP): AP - 3.6 mm, L \pm 3.0 mm, DV - 3.3 y **amígdala basolateral** (ABL): AP - 2.8 mm, L \pm 5 mm, DV - 8.5 mm. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con cemento dental mediante dos tornillos, 2 mm arriba del sitio de inyección. Se colocó un estilete en cada guía cánula para prevenir que las cánulas se taparan. En todos los experimentos después de la cirugía las ratas tuvieron una semana de recuperación antes de cualquier procedimiento conductual. Todos los experimentos se realizaron con grupos independientes, es decir cada rata fue implantada únicamente para una región cerebral y sólo tuvo una prueba de memoria.

Para la realización de las microinyecciones los estiletes fueron removidos y se insertaron agujas dentales, dirigidas a la zona de interés, las agujas se conectaron a microjeringas Hamilton de 10 μ l mediante una tubería de polietileno. A cada rata se le inyectó un volumen de 1 μ l por hemisferio cerebral a una tasa de 1 μ l/min en la corteza insular, corteza perirrinal e hipocampo y 0.5 μ l a una tasa de 0.5 μ l/min en la amígdala basolateral. Las agujas se mantuvieron un minuto extra después la inyección para permitir una mejor difusión del fármaco. La microinyección de la solución vehículo sirvió como control.

FÁRMACOS

El inhibidor de la síntesis de proteínas, **anisomicina** de *Streptomyces griseolus* (Sigma, St Louis, MO, USA) se disolvió en líquido cefaloraquídeo artificial (ACSF; 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄ H₂O, 1.5 mM MgSO₄ 7H₂O, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucosa, 2.5 mM CaCl₂; pH 7.4). Se utilizó una dosis de 120 mg/ml y se agregó una cantidad equimolar a la anisomicina de HCl. La microinyección de la solución vehículo sirvió como control. La dosis se escogió de acuerdo a estudios previos que indican que las dosis entre 100-125 mg/ml son efectivas para inhibir la síntesis de proteínas en más del 90% indistintamente de la estructura en la cual sea infundida (Rosenblum et al., 1993; Morris et al., 2006; Canal et al., 2007) el volumen se escogió de acuerdo a estudios previos donde se muestra que 1 μ l de tinta en la corteza difunde 1mm en promedio (Berman et al., 2000).

El agonista de los receptores GABA_A, **muscimol** (Sigma, St Louis, MO, USA)

se disolvió en solución salina fisiológica 0.9 % y se utilizó en una dosis 21.14 mM. La microinyección de la solución vehículo sirvió como control.

APARATOS EXPERIMENTALES

En los experimentos de memoria de reconocimiento de objetos, de reconsolidación y de consolidación de nueva información relacionada se utilizó una arena de campo abierto hecha de madera pintada de color gris, con el piso cubierto de aserrín (40 X 40 X 60 cm). En los experimentos de memoria de reconocimiento de objeto en contexto se utilizaron dos arenas con diferentes características físicas. Una arena cuadrada de madera pintada de color gris sirvió como uno de los contextos y otra circular hecha de material plástico rojo, (60 cm de alto X 40 cm de diámetro) como el segundo contexto. En ambas arenas el piso se cubrió con aserrín y en las paredes se colocaron diferentes figuras irregulares de cartón como señales espaciales.

Las arenas fueron colocadas en el mismo cuarto con una iluminación controlada. Se colocó una video cámara por encima de las cajas para grabar todas las sesiones. Los objetos a discriminar fueron focos blancos (6-cm diámetro y 11-cm largo) y frascos transparentes de vidrio (5.5-cm diámetro y 5-cm alto) y para los protocolos de reconsolidación y consolidación de nueva información relacionada se utilizó un objeto extra que fue un foco blanco en espiral (11-cm largo). Todos los objetos se fijaron al piso con Velcro, para evitar que fueran desplazados por las ratas. Los objetos se colocaron en las esquinas traseras de las cajas a 10 cm de distancia de las paredes. Para evitar señales olfativas los objetos se limpiaron minuciosamente con etanol 70% y el aserrín de las cajas se removió después de cada ensayo.

PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL

En cada sesión los animales se llevaron del *vivarium* al cuarto experimental 2 horas antes del inicio de cada sesión y se dejaron 2 horas extras al finalizar cada sesión para evitar condiciones de estrés que pudieran afectar la ejecución de la tarea, así como la consolidación de la misma.

En todos los experimentos fueron balanceados los contextos, los objetos y su posición relativa. Se consideró como conducta de exploración que el animal dirija la nariz en dirección del objeto a una distancia <1 cm y/o que lo toque con la nariz. Se calculó un índice de reconocimiento para los objetos que se define como el tiempo de exploración del objeto nuevo expresado en función del tiempo total dedicado a la exploración de los dos objetos (TIEMPO DE EXPLORACIÓN DEL OBJETO NUEVO / TIEMPO TOTAL DE EXPLORACIÓN). Un índice de 0.5 indica que no hay preferencia por alguno de los objetos, un índice de reconocimiento mayor a 0.5 indica que hay preferencia por el objeto novedoso (Ennaceur and Delacour, 1988).

TAREA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

Durante 5 días consecutivos los animales se manipularon durante un minuto e inmediatamente después se colocaron en la arena sin objetos durante 3 minutos. En la fase de muestra, las ratas se colocaron en la arena mirando hacia la pared opuesta al lugar donde se colocaron los objetos, para evitar inducir alguna tendencia hacia alguno de los objetos y se les permitió explorar libremente dos objetos idénticos, pudiendo ser dos frascos o dos

focos (que llamamos, A_1 y A_2) durante 10 minutos. La prueba de memoria se realizó 90 min (memoria de corto plazo) o 24 horas después (memoria de largo plazo). Durante la prueba de memoria, se le permitió explorar libremente una copia idéntica del objeto previamente presentado (familiar, que llamamos A_3) y un nuevo objeto (que llamamos, B_1) durante 3 minutos. La inyección de la solución vehículo o de anisomicina se realizó inmediatamente después de la fase de muestra (ver figura 2A). Los grupos probados en la memoria de corto plazo fueron: PRH-VEH (n=4), CI-VEH (n=6), HIP-VEH (n=8), ABL-VEH (n= 7); PRH-ANI (n=7), CI-ANI (n=5), HIP-ANI (n=5), ABL-ANI (n=8). Los grupos probados en la memoria de largo plazo fueron: PRH-VEH (n=9), CI-VEH (n=11), HIP-VEH (n=9), ABL-VEH (n=8); PRH-ANI (n=10), CI-ANI (n=11), HIP-ANI (n=12), ABL-ANI (n=6).

TAREA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO EN CONTEXTO

Durante 5 días consecutivos los animales se manipularon un minuto e inmediatamente después se habituaron a los dos contextos (separados por 90 min) sin objetos, durante 3 minutos. En la fase de muestra 1, la rata se colocó en una de las arenas (contexto 1) y se le permitió explorar libremente dos objetos diferentes [un foco y un frasco (A_1 y B_1)] durante 10 minutos. La fase de muestra 2 se realizó 24 horas después; en ésta, se colocó a la rata en el contexto 2 con dos objetos idénticos [copias de los objetos presentados previamente, pudiendo ser dos focos o dos frascos (A_2 y A_3)] y se le permitió explorarlos libremente durante 10 minutos. La prueba de memoria se realizó 90 minutos (memoria de corto plazo) o 24 horas (memoria de largo plazo) después de la fase de muestra 2. Durante la prueba de memoria, se

reintrodujo a la rata al contexto 2 y se le permitió explorar libremente durante 3 minutos una copia del objeto previamente presentado en el contexto 2 (A_4) y una copia del objeto presentado en el contexto 1 pero no presentado previamente en el contexto 2 (B_2). La solución vehículo o anisomicina se inyectó inmediatamente después de la fase de muestra 2, con el objetivo de evaluar la consolidación de la asociación de un objeto familiar presentado en un contexto novedoso (ver figura 3A). Los grupos probados para la memoria de corto plazo fueron: PRH-VEH ($n=7$), CI-VEH ($n=5$), HIP-VEH ($n=7$), ABL-VEH ($n=7$); PRH-ANI ($n=7$), CI-ANI ($n=5$), HIP-ANI ($n=7$), ABL-ANI ($n=5$). Para la prueba de memoria de largo plazo los grupos fueron: PRH-VEH ($n=10$), CI-VEH ($n=6$), HIP-VEH ($n=6$), ABL-VEH ($n=8$); PRH-ANI ($n=11$), CI-ANI ($n=9$), HIP-ANI ($n=8$), ABL-ANI ($n=9$).

PROTOCOLO DE RECONSOLIDACION Y DE ACTUALIZACION DE LA MEMORIA

Durante 5 días consecutivos todos los animales fueron manipulados por un minuto e inmediatamente después introducidos a la caja experimental sin objetos durante 3 minutos. En la fase de muestra, se le permitió explorar libremente dos objetos idénticos, (A_1 y A_2) durante 5 minutos. Se realizó una sesión de evocación 24 horas después, se presentaron dos objetos durante 5 minutos una copia del objeto presentado previamente en la fase de muestra (A_3) junto con uno nuevo (B). En el protocolo de reconsolidación se realizó una prueba de memoria 24 horas después se les permitió a las ratas explorar libremente un objeto presentado previamente (A_4) junto con uno nuevo (C) durante 3 minutos (ver figura 4A). En el protocolo de actualización de la

memoria se presentó un objeto que fue nuevo en la sesión de evocación (familiar, B₄) junto con uno nuevo (C) (ver figura 5A). Se realizaron inyecciones de vehículo o muscimol 30 min antes de la sesión de evocación y una segunda inyección de solución vehículo o anisomicina inmediatamente después de la sesión de evocación (ver figura 4A y 5A). Los grupos en el protocolo de reconocimiento fueron: VEH-VEH (n=8), VEH-ANI (n=7), MUSC-VEH (n=12), MUSC-ANI (n=7). Para el protocolo de actualización de la memoria los grupos fueron VEH-VEH (n=13), VEH-ANI (n=6), MUSC-VEH (n=7), MUSC-ANI (n=8).

ANALISIS ESTADISTICO

Los datos están expresados como medias \pm error estándar. Las diferencias estadísticas entre dos condiciones fueron determinadas mediante el uso de la prueba *t-student* no pareada y para determinar si un grupo es diferente del nivel de azar (0.5) se utilizó la prueba t de una muestra. Se utilizó una prueba de ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias entre los grupos (fármaco X área cerebral) un valor de $P < 0.05$ se aceptó como estadísticamente significativo.

HISTOLOGÍA

Después de los tratamientos conductuales, las ratas recibieron una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron transcárdicamente con una solución salina 0.9%. El cerebro se removió y se almacenó a 4°C en una solución de formaldehído al 4% por 24 horas. Los cerebros se cambiaron a una solución de sacarosa al 30% hasta que dejaron de flotar. Se realizaron

cortes coronales de 40 μm en la zona donde se implantaron las cánulas. Los cortes se montaron en laminillas con gelatina para procesarse con la tinción de violeta de cresilo y se examinaron bajo el microscopio de luz para verificar que el sitio donde fue implantada la cánula fuera el correcto.

RESULTADOS (PRIMERA PARTE DEL PROYECTO)

Todos los animales incluidos en el análisis tuvieron implantada la cánula en la zona de interés (ver figura 2).

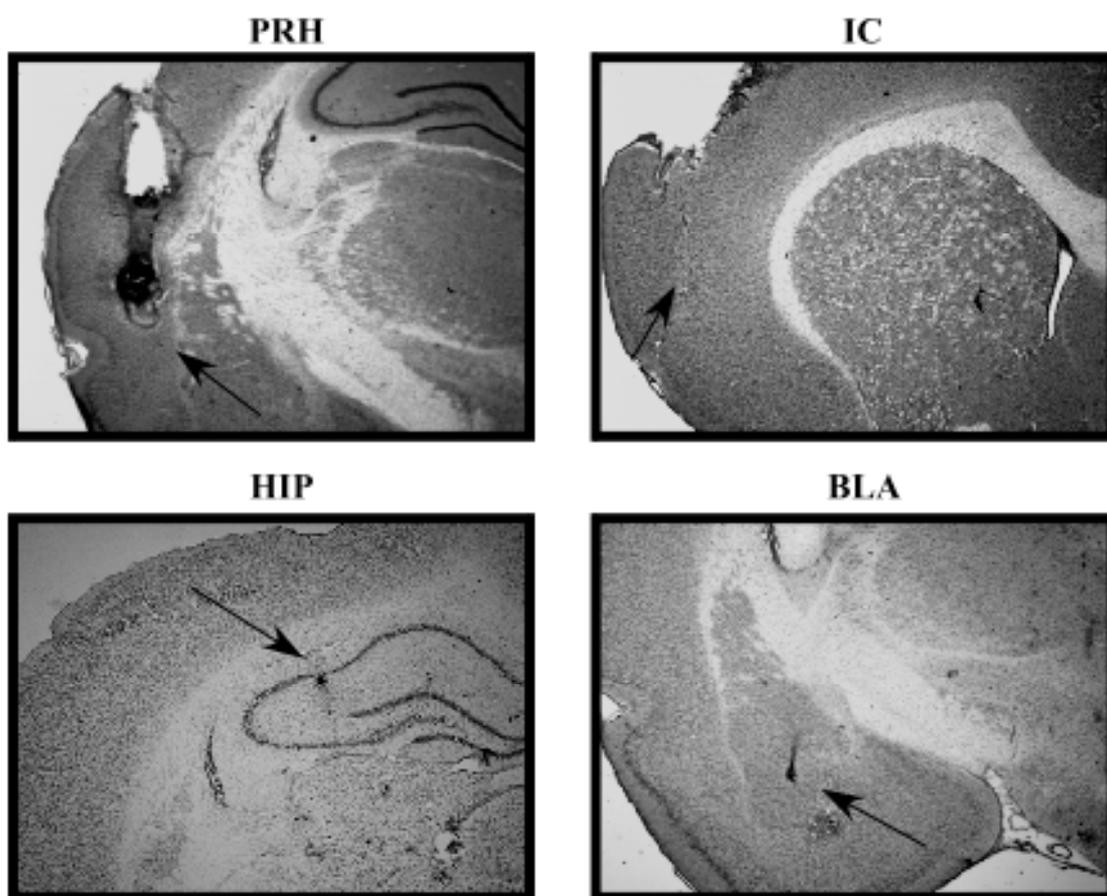


Figura 2. Microfotografías representativas de los sitios de inyección. Se muestra un corte coronal procesado con la tinción de violeta de cresilo de la: corteza perirrinal (PRH); corteza insular (CI); hipocampo dorsal (HIP) y amígdala basolateral (BLA). La flecha señala el sitio de inyección.

Experimentos de Reconocimiento de Objetos

Durante el entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos (fase de muestra) los grupos exhibieron un tiempo similar en la exploración a cada uno de los dos objetos idénticos (Tabla 1). Se calculó un índice de discriminación como el tiempo de exploración de uno de los objetos expresado en función del tiempo total dedicado a la exploración de los dos objetos. Una ANOVA de dos vías indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las fases de muestra para los grupos probados después en la memoria a corto o largo plazo (ver Tabla 1).

RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

	A) FASE DE MUESTRA (PARA MCP)		B) FASE DE MUESTRA (PARA MLP)	
	Vehículo	Anisomicina	Vehículo	Anisomicina
PRH	0.45 ± 0.03	0.47 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.01
CI	0.51 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.01
HIP	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.02
BLA	0.53 ± 0.02	0.51 ± 0.03	0.50 ± 0.00	0.49 ± 0.01
	$F_{7,42} = 1.20 \quad p = 0.32$		$F_{7,68} = 0.11 \quad p = 0.99$	

TABLA 1. Índices de reconocimiento en la fase de muestra (dos objetos idénticos) expresado en medias ± SEM (A) Fase de muestra para el grupo probado en memoria de corto plazo (MCP). (B) Fase de muestra para el grupo probado a largo plazo (MLP). Una prueba ANOVA de dos vías mostró que no existen diferencias estadísticas entre los grupos. Para el análisis uno de los objetos se seleccionó indistintamente como “novedoso”.

Como se puede observar en la figura 3A los animales se expusieron a dos copias de un mismo objeto (fase de muestra), y 90 minutos o 24 horas

después se les presentó una copia de uno de los objetos previamente mostrado, junto con un objeto novedoso (prueba de memoria). La Figura 3B muestra el índice de reconocimiento para la memoria de corto plazo exhibida para el objeto nuevo por los animales que recibieron la inyección de solución vehículo o de anisomicina después de la fase de muestra. Los animales microinyectados con la solución vehículo o anisomicina muestran una preferencia estadísticamente significativa hacia el objeto novedoso en la prueba de memoria de corto plazo. Una ANOVA de dos vías indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F_{7,42} = 0.58, NS$).

Interesantemente, en la prueba de memoria de largo plazo los animales microinyectados con anisomicina ya sea en la corteza insular o en la corteza perirrinal no mostraron preferencia entre el objeto novedoso y el objeto familiar. Una prueba ANOVA de dos vías indicó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F_{7,67} = 4.00, P < 0.001$). Una prueba post hoc de Fisher reveló que los grupos microinyectados con anisomicina en las cortezas perirrinal e insular fueron diferentes de los grupos control inyectados con solución vehículo ($P's < 0.01$) ver figura 3B.

RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

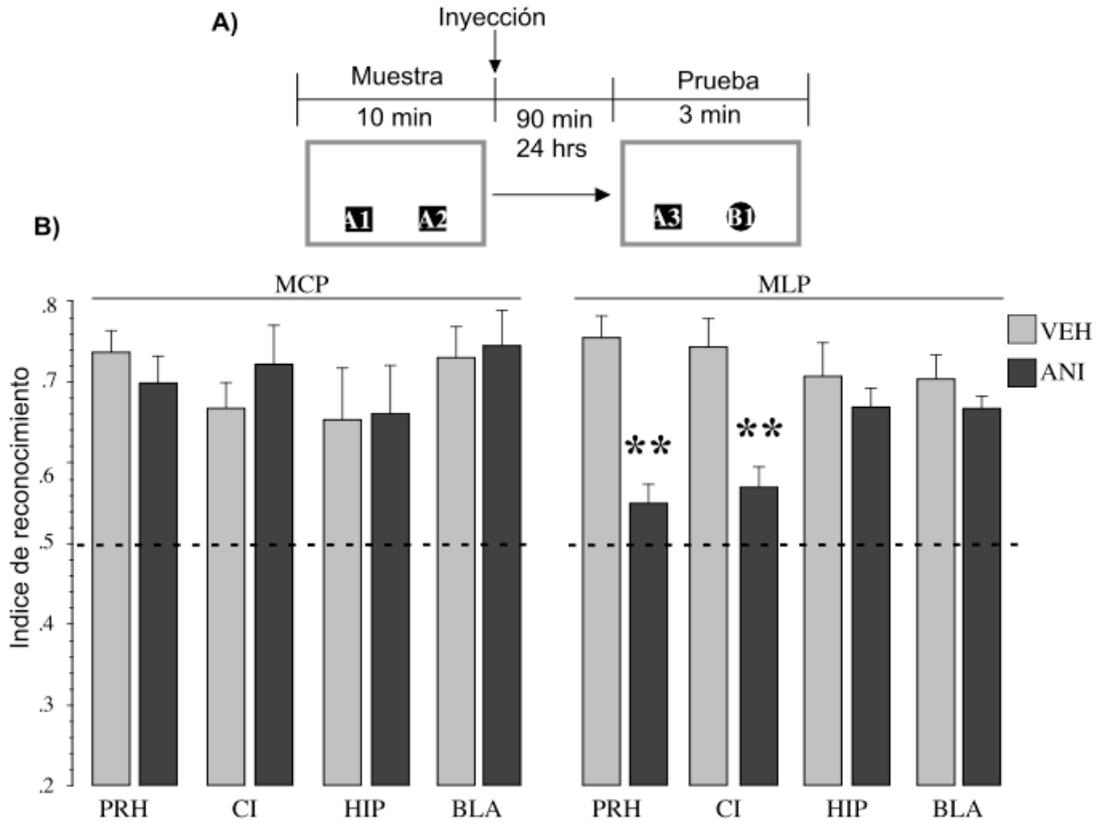


FIGURA 3. (A) Representación esquemática del protocolo conductual usado, 90 min (MCP), 24 h (MLP). (B) Índices de reconocimiento en la prueba de memoria. Una prueba ANOVA de dos vías para la memoria de corto plazo mostró que no existen diferencias entre los grupos. Una prueba ANOVA de dos vías para la memoria de largo plazo (MLP) mostró que existen diferencias significativas entre los grupos. Una prueba post hoc de Fisher indicó que los grupos inyectados con anisomicina (ANI) en PRH o CI son diferentes de todos los grupos controles inyectados con solución vehículo (VEH). ** $p < 0.01$.

Experimentos de reconocimiento de objeto en el contexto.

Con el objetivo de poder evaluar la memoria de reconocimiento del contexto diseñamos un protocolo basado en el paradigma de preferencia de un objeto familiar en un contexto novedoso (Dix and Aggleton, 1999), donde la asociación entre los objetos y las claves ambientales fueran las características predominantes a recordar (ver apéndice). Se permitió que las ratas exploraran libremente dos objetos diferentes en el contexto 1 (fase de muestra 1, ver Figura 4A). Veinticuatro horas después, se presentaron dos copias idénticas de uno de los objetos presentado el día anterior pero esta vez en un contexto diferente (fase de muestra 2). Las inyecciones de solución vehículo o de anisomicina se realizaron inmediatamente después de la segunda fase muestra. Durante la prueba las ratas se colocaron en el contexto 2 con una copia idéntica de cada uno de los objetos presentados en la fase de muestra 1 (ver Figura 4A). Bajo estas condiciones las ratas exploran más un objeto familiar que es presentado en un contexto novedoso, que un objeto familiar en un contexto en el cual había sido presentado previamente. Esta conducta se ve reflejada en un índice de reconocimiento alto (ver los grupos controles microinyectados con solución vehículo en la Figura 4B).

Durante la fase de muestra los grupos exhibieron un tiempo similar en la exploración para los dos objetos (Tabla 2). Una ANOVA indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la fase de muestra 1 para ambas condiciones, ya sea en los grupos probados en memoria de corto plazo; ($F_{7,42} = 0.90$, *NS*), o memoria de largo plazo ($F_{7,59}$

=0.91, *NS*). De manera similar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fase de muestra 2 para los grupos probados a corto plazo ($F_{7,42} = 1.75$, *NS*), o a largo plazo ($F_{7,59} = 0.76$, *NS*).

RECONOCIMIENTO DE OBJETO-CONTEXTO

	FASE DE MUESTRA 1		FASE DE MUESTRA 2	
	Vehículo	Anisomicina	Vehículo	Anisomicina
PRH	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.47 ± 0.02
CI	0.50 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.54 ± 0.01	0.47 ± 0.02
HIP	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.46 ± 0.03
BLA	0.55 ± 0.02	0.47 ± 0.06	0.52 ± 0.02	0.43 ± 0.03
	$F_{7,42} = 0.90$ $\rho = 0.51$		$F_{7,42} = 1.75$ $\rho = 0.12$	

	FASE DE MUESTRA 1		FASE DE MUESTRA 2	
	Vehículo	Anisomicina	Vehículo	Anisomicina
PRH	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.52 ± 0.01
CI	0.47 ± 0.02	0.51 ± 0.01	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.01
HIP	0.48 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.03
BLA	0.51 ± 0.03	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.03
	$F_{7,59} = 0.91$ $\rho = 0.50$		$F_{7,59} = 0.76$ $\rho = 0.61$	

TABLA 2. Índice de reconocimiento en la fase de muestra expresado como la media ± SEM. (A) fase de muestra 1 (dos objetos diferentes en el contexto 1) y fase de muestra 2 (dos objetos idénticos en el contexto 2) de los grupos probados en MCP. (B) Fase de muestra 1 (dos objetos diferentes en el contexto 1) y fase de muestra 2 (dos objetos idénticos en el contexto 2) de los grupos probados en MLP. Una prueba ANOVA de dos vías mostró que no existen diferencias significativas entre los grupos. Para el análisis uno de los objetos se seleccionó indistintamente como “novedoso” en la fase de muestra 1 y 2.

Como se observa en la Figura 4B, durante la prueba de memoria a los 90 minutos los animales, sin importar su condición experimental, mostraron preferencia por el objeto familiar presentado en el contexto novedoso. Esto es, las ratas microinyectadas ya sea con solución vehículo o anisomicina mostraron un índice de reconocimiento alto en la prueba de memoria de corto plazo. Una ANOVA de dos vías indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F_{7,42} = 0.23$, *NS*).

En la prueba de memoria de largo plazo sólo los animales microinyectados con anisomicina en el hipocampo, no mostraron preferencia hacia la relación del objeto familiar en un contexto novedoso. Una ANOVA de dos vías indicó que existen diferencias significativas entre los grupos ($F_{7,59} = 2.39$, $P < 0.05$). Una prueba post hoc de Fisher reveló que el grupo inyectado con anisomicina en el hipocampo fue diferente del resto de los grupos (p 's < 0.05), excepto del grupo BLA-ANI, indicando que el grupo tratado con anisomicina en el hipocampo fue el único que mostró un deterioro en la memoria de reconocimiento de contexto de largo plazo (ver Figura 4B).

RECONOCIMIENTO DEL OBJETO-CONTEXTO

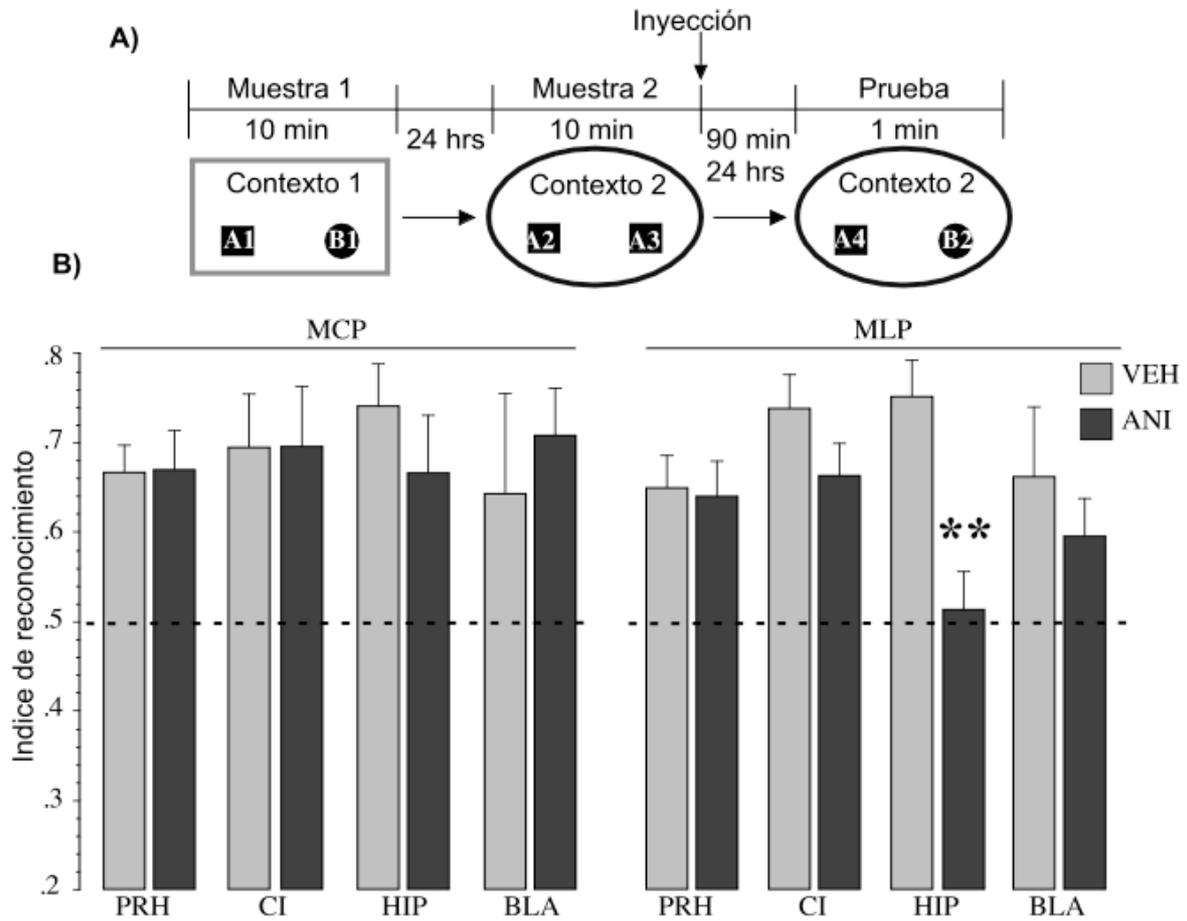


FIGURA 4. (A) Representación esquemática del protocolo experimental utilizado, 90 min (MCP), 24 h (MLP). (B) Índice de reconocimiento en la prueba de memoria de reconocimiento de la tarea de objeto-contexto. Una prueba ANOVA de dos vías para MCP mostró que no existen diferencias significativas entre los grupos. Una prueba de ANOVA de dos vías para MLP mostró que existen diferencias estadísticas entre los grupos. Una prueba post hoc de Fisher reveló que el grupo HIP-ANI es diferente del resto de los grupos ($p < 0.05$), excepto del grupo BLA-ANI. ** $p < 0.01$ vs HIP-VEH.

RESULTADOS (SEGUNDA PARTE DEL PROYECTO)

Para cumplir con los objetivos en esta segunda parte del proyecto se desarrollaron dos protocolos conductuales, el primero que llamamos protocolo de reconsolidación y el segundo lo denominamos protocolo de actualización de la memoria.

El protocolo de reconsolidación consiste en presentar dos objetos idénti

cos (A-A) durante la fase de muestra, 24 horas después se presenta un objeto consolidado mostrado en la fase de muestra (objeto a reconsolidar) y un objeto novedoso, durante esta fase llamada evocación (del objeto A). Se realizaron inyecciones en la corteza perirrinal de muscimol o solución salina 30 minutos antes de la evocación, y de anisomicina o ACSF inmediatamente después de la presentación de los objetos, con el fin de afectar diferencialmente la evocación y la reconsolidación del objeto A (ver figura 5). En este experimento se evaluó el efecto del bloqueo de la expresión conductual de la evocación sobre la reconsolidación de la memoria.

Reconsolidación

salina ACSF
muscimol anisomicina
(30 min) (inmediatamente después)

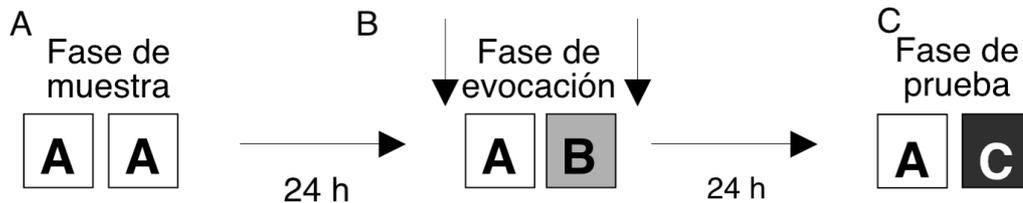


Figura 5. Se muestra el protocolo utilizado para evaluar la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. Se administró solución salina o muscimol 30 minutos antes de la evocación y anisomicina ó ACSF inmediatamente después de la evocación en la corteza perirrinal.

El protocolo de actualización de la memoria consiste en presentar dos objetos idénticos (A-A) durante la fase de muestra. Veinticuatro horas después, se presenta un objeto de la fase de muestra (ya consolidado) y un objeto novedoso que se espera se consolide en esta segunda presentación del objeto familiar (A-B); durante esta fase, llamada evocación (del objeto A), se realizan manipulaciones farmacológicas en la corteza perirrinal con el fin de afectar diferencialmente la evocación de A, de la consolidación de B (ver figura 6). Para este fin se realizaron inyecciones en la corteza perirrinal de muscimol o solución salina 30 minutos antes de la evocación y de anisomicina o ACSF inmediatamente después de la presentación de los objetos (A-B). Veinticuatro horas después se hizo una prueba de memoria para evaluar los efectos sobre la consolidación de B con la presentación de los objetos B-C, los animales que consoliden B deben tener preferencia por C (novedoso).

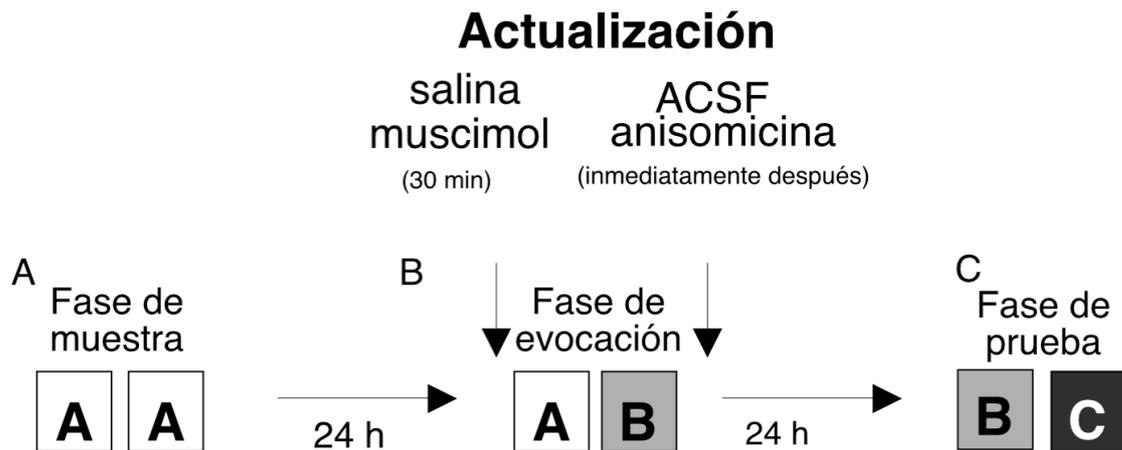


Figura 6. Se muestra el protocolo utilizado para evaluar la actualización de la memoria. Se administró solución salina o muscimol 30 minutos antes de la evocación y anisomicina o ACSF inmediatamente después de la evocación.

Todos los animales incluidos en el análisis tuvieron implantadas las cánulas bilateralmente en la zona de interés (ver figura 7).

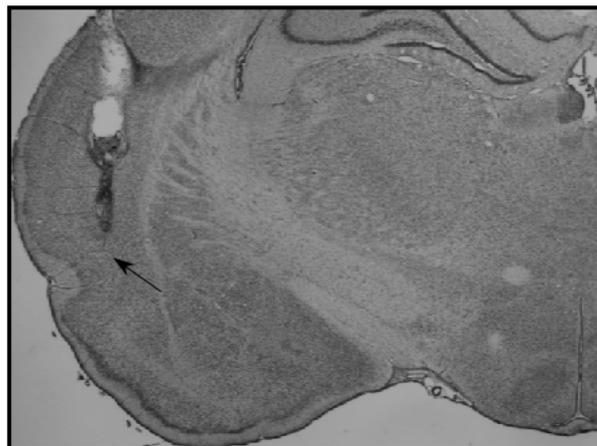


Figura 7. Microfotografía representativa del sitio de inyección. Se muestra un corte coronal procesado con la tinción de violeta de cresilo de la PRH: corteza perirrinal. La flecha señala el sitio de inyección.

Experimentos de reconsolidación de la memoria

Como se puede observar en la figura 6 los animales se expusieron a dos copias de un mismo objeto (fase de muestra) y 24 horas después se les presentó una copia de uno de los objetos previamente mostrado junto con un objeto novedoso (evocación de la memoria). Se administró solución salina o muscimol 30 minutos antes de la evocación y ACSF ó anisomicina inmediatamente después de la evocación. Veinticuatro horas después se les presentó una copia del objeto que fue familiar durante la evocación (objeto a reconsolidar) junto con un objeto nuevo. La Figura 8 muestra el índice de reconocimiento durante la fase de muestra, evocación y prueba de memoria, para los animales que recibieron la inyección de solución salina o muscimol y ACSF o anisomicina.

Durante la fase de muestra se observa un tiempo similar en la exploración a cada uno de los dos objetos idénticos. Se calculó un índice de reconocimiento como el tiempo de exploración de uno de los objetos expresado en función del tiempo total dedicado a la exploración de los dos objetos. Una prueba t de una muestra, indicó que la exploración de cada uno de los objetos no es diferente de la ejecución al azar, lo que indica que no tuvieron preferencia por ninguno de los dos objetos ($p=0.851$) (ver figura 8, fase de muestra).

Los animales inyectados con solución salina antes de la evocación muestran preferencia por el objeto novedoso lo que indica que evocaron la información del objeto familiar (a reconsolidar); una prueba t de una muestra, indicó

que la exploración del objeto novedoso es diferente de la ejecución al azar ($p=0.021$). Los animales que se inyectaron con muscimol antes de la evocación no muestran preferencia por ninguno de los dos objetos durante la fase de evocación, lo cual indica que no evocaron la información del objeto familiar (prueba t de una muestra, $p=0.340$ ver figura 8, evocación).

Para tener evidencia de una ejecución adecuada de la tarea bajo el efecto del muscimol, se analizó el tiempo total de exploración en la fase de evocación. Ambos grupos exhibieron tiempos similares en la exploración total a los objetos; una prueba t no pareada mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$t(25) = 1.04$, $P = \text{NS} (0.3)$]. Esta observación indica que el muscimol bloquea específicamente la evocación conductual, sin afectar las habilidades motoras, la motivación a explorar los objetos, o la ejecución de la tarea (ver apéndice figura 16A).

En la prueba de memoria realizada 24 horas después de la evocación, los animales del grupo salina-ACSF exploraron preferentemente el objeto novedoso lo que indica que re consolidaron el objeto familiar durante la evocación (prueba t de una muestra, $p=0.05$). El grupo al que se le inyectó muscimol-ACSF mostró preferencia por el objeto novedoso, aún cuando se bloqueo la expresión conductual de la evocación, indicando que estos animales son capaces de re consolidar la información (prueba t de una muestra, $p=0.014$, ver figura 8, prueba).

Por otra parte, en los animales a los que se les inyectó salina-anisomicina se bloqueó la reconsolidación del objeto previamente consolidado, y esto se puede observar en la figura 8 donde los animales no tienen preferencia por ninguno de los objetos en la prueba realizada 24 h después (prueba *t* de una muestra, $p=0.981$). Los animales del grupo muscimol-anisomicina mostraron un efecto similar al no tener preferencia por ninguno de los dos objetos en la prueba realizada 24 h después (prueba *t* de una muestra, $p=0.981$, ver figura 8, prueba).

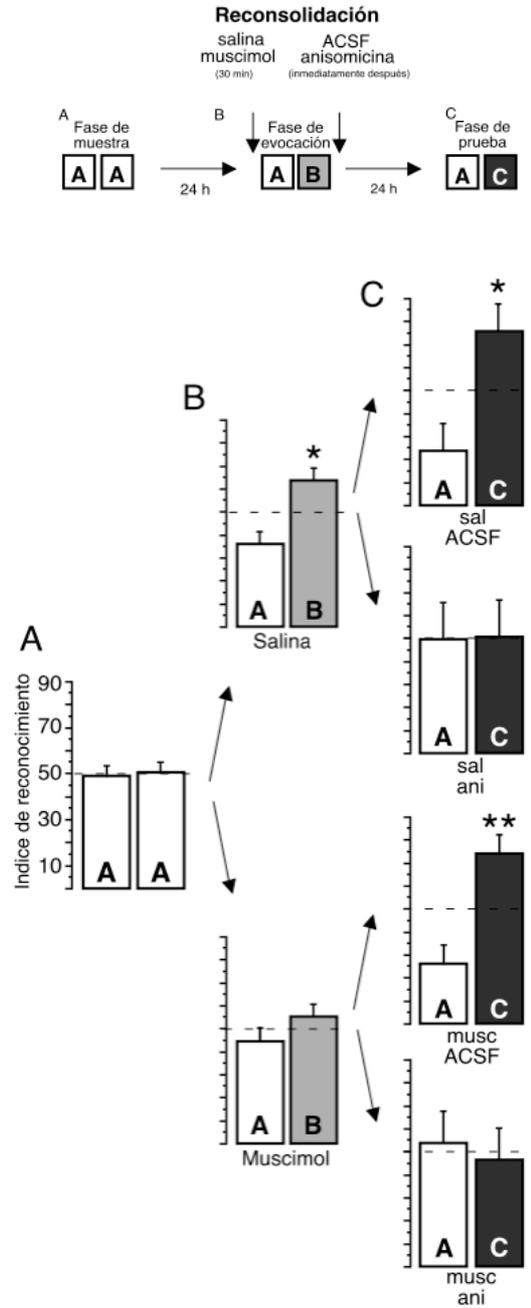


Figura 8. Se muestran los índices de reconocimiento para la fase de muestra, la evocación y la prueba. Un índice por arriba de 0.5 refiere preferencia a uno de los objetos. Se observa que los animales que tienen la inyección de muscimol en la corteza perirral durante la evocación no tienen preferencia por ningún objeto, lo que indica la imposibilidad de evocar el objeto familiar, aun así estos animales reconsolidan la información del objeto familiar, lo que se observa el día de la prueba al preferir C (objeto novedoso). Se observa que en los grupos en los que se administró anisomicina inmediatamente después de la evocación se afecta la reconsolidación de A, efecto que se observa en la prueba realizada 24 horas después. * $p < 0.05$, ** $p = 0.01$ [los grupos fueron SAL/ACSF (n=8), SAL/ANI (n=12), MUSC/ACSF (n=7) MUSC/ANI (n=7)].

Experimentos de actualización de la memoria

Como se puede observar en la figura 9 los animales se expusieron a dos copias de un mismo objeto (A-A, fase de muestra) y 24 horas después se les presentó una copia de uno de los objetos previamente presentado junto con un objeto novedoso (A-B, evocación de la memoria). Veinticuatro horas después se les presentó una copia del objeto nuevo durante la evocación (familiar en la prueba) junto con un objeto nuevo (A-C). La Figura 9 muestra el índice de reconocimiento exhibido durante la fase de muestra, evocación y prueba de memoria, para los animales que recibieron la inyección de solución salina ó muscimol y ACSF ó anisomicina. En la fase de muestra se observa un tiempo similar en la exploración a cada uno de los dos objetos idénticos (prueba *t* de una muestra, $p=0.458$ ver figura 9, fase de muestra).

Los animales inyectados con solución salina antes de la evocación muestran preferencia por el objeto novedoso lo que indica que evocaron la información del objeto familiar (previamente consolidado) (prueba *t* de una muestra, $p=0.0002$). Los animales que se inyectaron con muscimol antes de la evocación no muestran preferencia por ninguno de los dos objetos durante la fase de evocación, lo cual indica que no evocaron la información del objeto familiar (prueba *t* de una muestra, $p=0.162$ ver figura 9, evocación).

El tiempo total de exploración en la fase de evocación, fue similar en ambos grupos, sugiriendo que bajo el efecto del muscimol los animales ejecutaron adecuadamente la tarea; una prueba *t* no pareada mostró que no existen

diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$t(32) = 0.29$, $P = \text{NS} (0.76)$] (ver apéndice figura 16B).

En la prueba de memoria realizada 24 horas después de la evocación, los animales del grupo salina-ACSF mostraron preferencia por el objeto novedoso, lo que indica que consolidaron el objeto (que fue novedoso durante la evocación) (prueba t de una muestra, $p=0.0007$). El grupo al que se le inyectó muscimol-ACSF mostró preferencia por el objeto novedoso durante la prueba, lo que indica que aunque se haya bloqueado la expresión conductual de la evocación los animales fueron capaces de consolidar la información del objeto (que fue novedoso durante la evocación) (prueba t de una muestra, $p=0.01$ ver figura 9, prueba).

Por otra parte, en los animales a los que se les inyectó salina-anisomicina se afectó la consolidación del objeto novedoso, y esto se puede observar en la figura 9, donde los animales no tienen preferencia por ninguno de los objetos en la prueba realizada 24 h después (t de una muestra, $p=0.749$). Los animales del grupo muscimol-anisomicina mostraron un efecto similar al no tener preferencia por ninguno de los dos objetos en la prueba realizada 24 h después, lo cual indica que la consolidación del objeto nuevo se vio afectada (t de una muestra, $p=0.423$ ver figura 9, prueba).

DISCUSIÓN

Consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos y objetos en contexto

La primera parte de este proyecto estuvo enfocada a investigar la contribución de diferentes regiones del lóbulo temporal en la consolidación de las tareas de memoria de reconocimiento de objetos y de objetos en contexto. Estas dos tareas nos permiten disociar dos componentes importantes de la memoria de reconocimiento, uno que es la identidad del objeto, es decir el juicio de familiaridad hacia las características particulares del objeto (la representación completa del estímulo), y el segundo es el contexto específico donde fue experimentado (Eichenbaum et al., 2007). La tarea de reconocimiento de objetos está basada en la discriminación de la familiaridad del estímulo y para una adecuada ejecución el sujeto necesita responder “qué” estímulo experimentó previamente. Por otro lado la tarea de objeto en contexto está basada en la asociación de un estímulo con un contexto específico y para esto el sujeto necesita recordar “dónde” experimentó previamente el estímulo. Es conveniente hacer notar que en nuestro protocolo de la tarea de objeto en contexto, tanto los objetos como el contexto eran familiares en la prueba de memoria, la única información novedosa era la relación entre ellos.

Cuando el inhibidor de síntesis de proteínas se microinyectó inmediatamente después de la fase de muestra en las cortezas insular o perirrinal se dañó la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, pero no la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos en contexto. Por otro lado, la administración de anisomicina en el hipocampo dorsal bloqueó la

consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos en contexto, pero no la de reconocimiento de objetos. Cuando la anisomicina se administró en la BLA no se afectó la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos ni de objetos en contexto. Se ha descrito que la memoria de corto plazo no requiere de la síntesis de proteínas (Davis et al., 1980); como muestran los resultados, la inyección de anisomicina en ninguna de estas regiones tuvo efecto en la memoria de corto plazo ya sea en la tarea de reconocimiento de objetos y de objetos en contexto.

El grupo de Gold, reportó que la anisomicina administrada en la amígdala o en el hipocampo afectaba la memoria de largo plazo en la tarea de prevención pasiva. También mostraron la desregulación de las aminas biogénicas en la amígdala y en el hipocampo por la inyección de la anisomicina; los niveles de norepinefrina, dopamina y serotonina se incrementaron rápida y sustancialmente (hasta 17,000%) en la amígdala, además en el hipocampo se incremento la liberación de acetilcolina. Por esta razón, sugirieron que los efectos observados en la memoria podrían deberse al menos en parte, a la desregulación de estos neurotransmisores. En este proyecto de doctorado, no se analizó la liberación de los neurotransmisores que se vieron incrementados en los estudios del grupo de Gold; sin embargo, aún existiendo estos incrementos en la amígdala, no se observó que afectara la ejecución de los animales en la prueba de memoria de corto plazo, ni de largo plazo en ninguna de las dos versiones de la tarea. En el caso de la inyección de anisomicina en el hipocampo la memoria de corto plazo no se

vio afectada, lo cual podría descartar un efecto inespecífico del fármaco (Canal et al., 2007; Qi and Gold, 2009) .

La memoria de reconocimiento ha sido relacionada con una red de regiones corticales del lóbulo temporal, que incluyen a las cortezas perirrinal, parahipocampal, entorrinal y al hipocampo (Aggleton and Brown, 1999; Malkova and Mishkin, 2003; Reed et al., 2004).

Se ha sugerido que las distintas regiones del lóbulo temporal están diferencialmente involucradas en el proceso de la memoria de reconocimiento; se ha descrito que la corteza perirrinal es necesaria para que los animales ejecuten bien la tarea de reconocimiento de objetos, pero no las tareas con componentes contextuales y que el hipocampo es necesario cuando la tarea tiene un componente contextual (Brown and Aggleton, 2001). Nuestros datos apoyan esta doble disociación funcional entre el hipocampo y la corteza y proveen evidencia de la participación de estas estructuras específicamente en la consolidación de la memoria de reconocimiento.

La corteza perirrinal es una región de asociación multimodal que está densamente interconectada con áreas que representan diversas modalidades sensoriales, permitiendo el intercambio de información entre la corteza perirrinal y las cortezas unimodales (Burwell et al., 1995). Esta conectividad recíproca junto con los hallazgos de estudios donde evalúan la participación de la memoria de reconocimiento para diferentes modalidades sensoriales (Otto and Eichenbaum, 1992; Suzuki et al., 1993; Buffalo et al., 1999;

Gutierrez et al., 2004), apoyan la idea de que múltiples sistemas sensoriales relacionados al reconocimiento de un estímulo activan la corteza perirrinal (Brown and Aggleton, 2001; Murray and Richmond, 2001). De esta manera, la asociación de las características individuales que representan a un estímulo como un todo (asociación intra-estímulo de los componentes) probablemente sean representados en la corteza rinal, mientras que las asociaciones entre el estímulo y el ambiente (contexto) sean representadas en el hipocampo (Brown and Aggleton, 2001).

Aunque se ha puesto particular atención a la corteza perirrinal, es claro que otras regiones corticales son también importantes para el procesamiento de la memoria de reconocimiento. Recientemente se ha reportado que se requiere de la corteza insular para que ocurra la consolidación de la memoria de reconocimiento tanto de objetos como de estímulos gustativos (Bermudez-Rattoni et al., 2005). Estos resultados junto, con los obtenidos en este proyecto, sugieren fuertemente que las estructuras corticales del lóbulo temporal localizadas a lo largo del surco rinal son críticas para el almacenamiento de la memoria de reconocimiento de objetos.

En un estudio realizado por el grupo de Mumby, reportaron que la lesión permanente del hipocampo provocaba un déficit en los animales para recordar objetos familiares en un lugar nuevo por períodos cortos de tiempo (5 min) (Mumby et al., 2002). En dicho estudio se sugiere una participación del hipocampo en la memoria de reconocimiento de los objetos en contexto; sin embargo, la metodología utilizada (lesiones permanentes), no permite

identificar en que parte del proceso está participando el hipocampo (adquisición, evocación o consolidación). En nuestro estudio, se realizó la manipulación farmacológica inmediatamente después de la adquisición, con el propósito de afectar específicamente la consolidación. Nuestros resultados muestran que se requiere de la síntesis de proteínas en el hipocampo para que ocurra la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos en contexto.

En conjunto, los resultados de la primera parte de este proyecto muestran que las distintas regiones del lóbulo temporal tienen una participación diferencial en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos y de objetos en contexto.

Reconsolidación y actualización de la memoria

Teniendo en cuenta que la corteza perirrinal es una estructura que participa en la consolidación de la memoria de reconocimiento, en la segunda parte de este estudio se evaluó la participación de dicha estructura en la reconsolidación de la memoria mediante la inhibición de la síntesis de proteínas. Los resultados mostraron que la inhibición de la síntesis de proteínas en corteza perirrinal afecta la reconsolidación. La relevancia de este resultado es que por primera vez se muestra que esta corteza participa en la reconsolidación de la memoria y en particular en la memoria de reconocimiento de objetos. Estos datos nos permitieron utilizar a la corteza perirrinal como área cerebral de estudio para nuestro siguiente objetivo, que fue evaluar el papel de la evocación explícita en la reconsolidación y

actualización de la memoria. La teoría actual de la reconsolidación postula que la memoria previamente consolidada se desestabiliza después de ser evocada y para volver a estabilizarla se requiere una vez más de la síntesis de proteínas (Nader et al., 2000b; Nader and Hardt, 2009). Uno de los controles conductuales más utilizados en los experimentos de reconsolidación de la memoria, es hacer la manipulación para afectar la reconsolidación (por ejemplo la inhibición de la síntesis de proteínas) en ausencia de la evocación explícita y demostrar que la memoria permanece intacta; de esta manera, se ha llegado a la conclusión que la evocación es indispensable para que ocurra la reconsolidación (Nader et al., 2000a; Rossato et al., 2007). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la administración de muscimol en la corteza perirrinal afecta la expresión conductual de la evocación en la tarea de reconocimiento de objetos. Interesantemente la reconsolidación y la actualización de la memoria ocurrieron aún cuando la evocación fue bloqueada. Igualmente interesante es el hecho de que la reconsolidación y la actualización de la memoria fueron dañados (después de la inhibición de la síntesis de proteínas) cuando la expresión de la evocación fue bloqueada. Estos datos sugieren fuertemente que la evocación explícita no es un requisito indispensable para que se lleven a cabo dichos procesos de memoria. Estos resultados sugieren que la evocación y la reactivación de la memoria podrían ser procesos dissociables e independientes.

Pero si no es la evocación lo que inicia la reconsolidación, ¿qué otro componente de la memoria lo hace? Existe evidencia que muestra que la reconsolidación sólo ocurre cuando la memoria es actualizada mediante

información relevante (Rodríguez-Ortiz et al., 2005; Morris et al., 2006; Forcato et al., 2007; Hubbach et al., ; Rossato et al., 2007; Rodríguez-Ortiz et al., 2008; Winters et al., 2009), lo que sugiere que la actualización de la información podría activar a la memoria e iniciar la reconsolidación, a través de información entrante, capaz de fortalecer o modificar a la memoria consolidada.

Estudios previos indican que después de la activación la memoria previamente consolidada, ésta es desestabilizada a través de un proceso dependiente de proteosoma al que le sigue un proceso de reestabilización dependiente de síntesis de proteínas (Lee, 2008; Lee et al., 2008).

Esta desestabilización de la memoria permitiría la integración de información relacionada en el largo plazo. De esta manera, lo que proponemos es que la entrada de nueva información es evaluada y la memoria que está relacionada es desestabilizada, después de lo cual, ambas informaciones (tanto la desestabilizada como la información entrante) son almacenadas a largo plazo en un trazo de memoria actualizado.

Se ha reportado que la inyección de anisomicina en la amígdala central pero no en la BLA daña la consolidación y la reconsolidación (García-DeLaTorre et al., 2009), mientras que la inyección de NBQX (antagonista de los receptores AMPA) en la BLA daña la expresión conductual de la evocación en el condicionamiento aversivo al sabor (datos de nuestro laboratorio no publicados). Estos datos sugieren que distintas subregiones de la amígdala

podrían estar involucrados diferencialmente en la evocación y la activación de la memoria. Sin embargo, hacen falta estudios que nos permitan discernir si en la corteza perirrinal existen regiones donde se lleven a cabo diferencialmente la evocación y la activación de la memoria, además de estudios enfocados a dilucidar los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la activación de la memoria. Por esta razón en los experimentos futuros estudiaremos la expresión de la proteína *Arc* (proteína asociada al citoesqueleto regulada por la actividad) que es una proteína utilizada para evaluar la activación neuronal ya que su expresión basal es muy baja. De esta manera, si la evocación explícita es diferente de la activación de la memoria, la expresión de la proteína *Arc* nos podría indicar si las estructuras relacionadas con la consolidación se reactivan aún cuando la evocación esté bloqueada.

En conclusión, nuestros resultados muestran claramente que las distintas regiones del lóbulo temporal tienen una participación diferencial en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, donde la síntesis de proteínas en las cortezas insular y perirrinal son indispensables para la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos y que para la consolidación de la memoria de objetos en contexto es necesaria la síntesis de proteínas en el hipocampo. Los resultados de este trabajo también muestran que la corteza perirrinal participa en la reconsolidación de la memoria de reconocimiento y que aún en ausencia de la evocación conductual la inhibición de síntesis de proteínas afecta la reconsolidación; sin embargo, la memoria puede ser reconsolidada y actualizada aún en ausencia

de la evocación conductual, dando evidencia de que la evocación explícita no es necesaria para que ocurra la reconsolidación.

CONCLUSIONES (PRIMERA PARTE DEL PROYECTO)

Los resultados muestran que las cortezas insular y perirrinal son indispensables para la consolidación de la memoria de reconocimiento para estímulos individuales (tarea de reconocimiento de objetos), mientras que el hipocampo es indispensable para la consolidación de la memoria de estímulos en relación con un contexto específico (tarea de reconocimiento de objetos en contexto). La amígdala no parece tener ninguna participación en la consolidación de estas dos tareas (ver tabla 3).

	CONSOLIDACION DE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO			
	OBJETOS		OBJETO EN CONTEXTO	
	CORTO PLAZO	LARGO PLAZO	CORTO PLAZO	LARGO PLAZO
Insular	✓	X	✓	✓
Perirrinal	✓	X	✓	✓
Hipocampo	✓	✓	✓	X
Amígdala	✓	✓	✓	✓

TABLA 3. Conclusiones de los experimentos en los que se evaluó la participación de algunas estructuras del lóbulo temporal en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos y objetos en contexto. Se observa que la inhibición de la síntesis de proteínas en las cortezas perirrinal e insular afectan la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, mientras que la inhibición de la síntesis de proteínas en el hipocampo afecta la consolidación de la memoria de reconocimiento para la tarea de objeto en contexto.

CONCLUSIONES (SEGUNDA PARTE DEL PROYECTO)

Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de la síntesis de proteínas en la corteza perirrinal daña la reconsolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. Además, que el bloqueo de la expresión de la evocación explícita no afecta la reconsolidación o la consolidación de nueva información, ya que se observa que los animales a los que se les inyectó muscimol prefieren explorar más el objeto novedoso en la prueba realizada 24 horas después. Sin embargo, la inyección de anisomicina daña la reconsolidación y la consolidación de nueva información aún en ausencia de la evocación, lo cual se ve reflejado al no tener preferencia por ninguno de los objetos durante la prueba de memoria. Los datos obtenidos sugieren que la evocación explícita no es necesaria para que ocurra la reconsolidación como lo sugiere la teoría actual y que durante la reconsolidación puede ocurrir la actualización de la memoria.

REFERENCIAS

- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22:425-444; discussion 444-489.
- Akirav I, Maroun M (2006) Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex* 16:1759-1765.
- Ben Mamou C, Gamache K, Nader K (2006) NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci* 9:1237-1239.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 20:7017-7023.
- Bermudez Rattoni F (2004) Molecular Mechanisms of Taste-Recognition Memory. *Nature Reviews Neuroscience* 5:209-217.
- Bermudez-Rattoni F, Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL (2005) Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 12:447-449.
- Bermúdez-Rattoni F y Prado-Alcalá RA (2001) Memoria: dónde reside y cómo se forma. México: Trillas.
- Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2008) Reconsolidation and the fate of consolidated memories. *Neurotox Res* 14:353-358.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004) Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14515-14520.
- Brown MW, Aggleton JP (2001) Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2:51-61.
- Bucherelli C, Tassoni G (1992) Engram activation reinstates the susceptibility of consolidated memory traces to retrograde amnesia by functional blockade of parabrachial nuclei. *Behav Brain Res* 51:61-65.
- Buffalo EA, Ramus SJ, Clark RE, Teng E, Squire LR, Zola SM (1999) Dissociation between the effects of damage to perirhinal cortex and area TE. *Learn Mem* 6:572-599.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* 5:390-408.
- Bussey TJ, Muir JL, Aggleton JP (1999) Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. *J Neurosci* 19:495-502.
- Canal CE, Chang Q, 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.
- Corcoran KA, Maren S (2001) Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J Neurosci* 21:1720-1726.
- Da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2008) Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus* 18:29-39.
- Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96:518-559.

- Davis HP, Rosenzweig MR, Bennett EL, Squire LR (1980) Inhibition of cerebral protein synthesis: dissociation of nonspecific effects and amnesic effects. *Behav Neural Biol* 28:99-104.
- Dix SL, Aggleton JP (1999) Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res* 99:191-200.
- Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C (2007) The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30:123-152.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59.
- Ennaceur A, Aggleton JP (1997) The effects of neurotoxic lesions of the perirhinal cortex combined to fornix transection on object recognition memory in the rat. *Behav Brain Res* 88:181-193.
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1996) Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behav Brain Res* 80:9-25.
- Forcato C, Burgos VL, Argibay PF, Molina VA, Pedreira ME, Maldonado H (2007) Reconsolidation of declarative memory in humans. *Learn Mem* 14:295-303.
- Garcia-DeLaTorre P, Rodriguez-Ortiz CJ, Arreguin-Martinez JL, Cruz-Castaneda P, Bermudez-Rattoni F (2009) Simultaneous but not independent anisomycin infusions in insular cortex and amygdala hinder stabilization of taste memory when updated. *Learn Mem* 16:514-519.
- Graham KS, Gaffan D (2005) The role of the medial temporal lobe in memory and perception: evidence from rats, nonhuman primates and humans. *Q J Exp Psychol B* 58:193-201.
- Gutierrez R, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F (2004) Perirhinal cortex muscarinic receptor blockade impairs taste recognition memory formation. *Learn Mem* 11:95-101.
- Holt W, Maren S (1999) Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *J Neurosci* 19:9054-9062.
- Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L (2007) Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem* 14:47-53.
- Iordanov MS, Pribnow D, Magun JL, Dinh TH, Pearson JA, Chen SL, Magun BE (1997) Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol Cell Biol* 17:3373-3381.
- Izquierdo LA, Barros DM, da Costa JC, Furini C, Zinn C, Cammarota M, Bevilaqua LR, Izquierdo I (2007) A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 88:160-166.
- Lechner HA, Squire LR, Byrne JH (1999) 100 years of consolidation--remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem* 6:77-87.
- Lee JL (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264-1266.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, Choi SL, Lee SH, Kim H, Kaang BK (2008) Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319:1253-1256.

- Lima RH, Rossato JI, Furini CR, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M (2009) Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 91:466-472.
- Malkova L, Mishkin M (2003) One-trial memory for object-place associations after separate lesions of hippocampus and posterior parahippocampal region in the monkey. *J Neurosci* 23:1956-1965.
- Mandler G (1980) The judgment of previous occurrence. *Psychological Review* 87:252-271.
- Maroun M, Akirav I (2009) Differential involvement of dopamine D1 receptor and MEK signaling pathway in the ventromedial prefrontal cortex in consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Learn Mem* 16:243-247.
- McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ (1968) Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160:554-555.
- Mishkin M (1978) Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 273:297-298.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA (2006) Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50:479-489.
- Moser MB, Moser EI (1998) Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7535-7542.
- Mumby DG, Pinel JP (1994) Rhinal cortex lesions and object recognition in rats. *Behav Neurosci* 108:11-18.
- Mumby DG, Tremblay A, Lecluse V, Lehmann H (2005) Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus* 15:1050-1056.
- Mumby DG, Gaskin S, Glenn MJ, Schramek TE, Lehmann H (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem* 9:49-57.
- Murray EA, Mishkin M (1986) Visual recognition in monkeys following rhinal cortical ablations combined with either amygdectomy or hippocampectomy. *J Neurosci* 6:1991-2003.
- Murray EA, Mishkin M (1998) Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci* 18:6568-6582.
- Murray EA, Richmond BJ (2001) Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Curr Opin Neurobiol* 11:188-193.
- Murray EA, Graham KS, Gaffan D (2005) Perirhinal cortex and its neighbours in the medial temporal lobe: contributions to memory and perception. *Q J Exp Psychol B* 58:378-396.
- Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10:224-234.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000a) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.

- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000b) The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-219.
- Otto T, Eichenbaum H (1992) Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task. *Behav Neurosci* 106:762-775.
- Paxinos G, & Watson, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates* (3rd ed.). San Diego.: Academic Press.
- Perrin G, Ferreira G, Meurisse M, Verdin S, Mouly AM, Levy F (2007) Social recognition memory requires protein synthesis after reactivation. *Behav Neurosci* 121:148-155.
- Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241-246.
- Qi Z, Gold PE (2009) Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. *Learn Mem* 16:308-314.
- Ramos JM (2008) Perirhinal cortex lesions produce retrograde amnesia for spatial information in rats: consolidation or retrieval? *Learn Mem* 15:587-596.
- Reed CL, Shoham S, Halgren E (2004) Neural substrates of tactile object recognition: an fMRI study. *Hum Brain Mapp* 21:236-246.
- Reed JM, Squire LR (1997) Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behav Neurosci* 111:667-675.
- Rodriguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutierrez R, Bermudez-Rattoni F (2005) Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* 12:533-537.
- Rodriguez-Ortiz CJ, Garcia-DeLaTorre P, Benavidez E, Ballesteros MA, Bermudez-Rattoni F (2008) Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiol Learn Mem* 89:352-359.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59:49-56.
- Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2007) On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14:36-46.
- Sara SJ (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73-84.
- Squire LR, Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13515-13522.
- Squire LR, Wixted JT, Clark RE (2007) Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8:872-883.
- Stupien G, Florian C, Rouillet P (2003) Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol Learn Mem* 80:32-41.
- Suzuki WA, Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1993) Lesions of the perirhinal and parahippocampal cortices in the monkey produce long-lasting memory impairment in the visual and tactual modalities. *J Neurosci* 13:2430-2451.
- Tronson NC, Taylor JR (2007) Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8:262-275.
- Winters BD, Tucci MC, DaCosta-Furtado M (2009) Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn Mem* 16:545-553.

Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ (2004) Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 24:5901-5908.

APÉNDICE

Existe una modificación al protocolo de la tarea de reconocimiento de objetos, que permite evaluar la asociación de los objetos con un contexto específico. Esta tarea basada en la preferencia de los roedores a explorar la novedad de los estímulos evalúa el reconocimiento de un objeto familiar en un contexto diferente al cual había sido presentado previamente (Dix and Aggleton, 1999).

En el protocolo estándar para evaluar la memoria de reconocimiento de objetos en contexto, se habitúa a los animales a dos contextos diferentes para que se familiaricen con ellos. Después de la familiarización a los contextos, se presentan dos objetos idénticos en uno de los contextos, y después de un intervalo de tiempo, se presenta un par diferente de objetos idénticos, en el segundo contexto. La prueba consiste en la presentación de uno de los objetos en el mismo contexto y un objeto familiar pero que no había sido presentado en ese contexto, evaluando de esta manera la asociación novedosa entre el objeto y el contexto (ver figura 10).

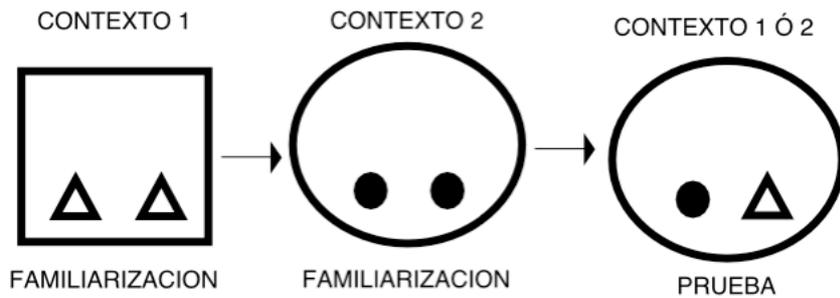


FIGURA 10. Protocolo estándar de la tarea de reconocimiento del objeto en el contexto. Con este protocolo se puede evaluar la asociación novedosa entre un objeto familiar y un contexto específico en este ejemplo el objeto representado por el triángulo en el contexto 2.

Basados en este protocolo de reconocimiento de objeto en el contexto, desarrollamos un protocolo que nos permitiría manipular la consolidación de un objeto en un contexto específico. La razón por la cual no utilizamos el protocolo estándar fue porque si realizábamos la inyección de anisomicina inmediatamente después de cualquiera de las dos fases de familiarización, podríamos afectar tanto la consolidación de los objetos, como de los contextos y no la consolidación de la asociación de uno de los objetos con un contexto específico. Además, el protocolo estándar no se había podido utilizar para medir memoria de largo plazo, en nuestro protocolo aumentamos el tiempo de familiarización a los objetos con el fin de que la memoria de consolidara a largo plazo.

En el protocolo que desarrollamos los animales fueron habituados a dos contextos diferentes físicamente (color, forma y de materiales distintos). Se introdujo a los animales a cada contexto sin objetos por 3 minutos cada día, durante 5 días consecutivos, los animales fueron habituados a los dos

contextos diariamente, la habituación para cada contexto fue separada por 90 minutos (ver figura 11).

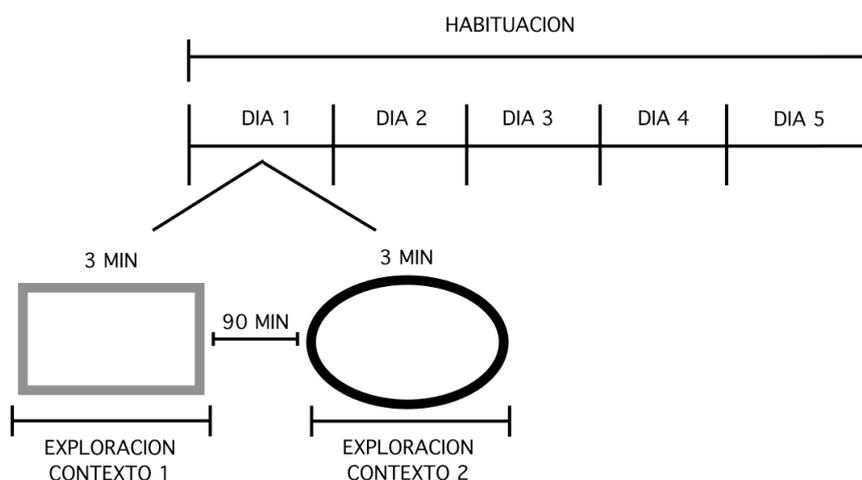


FIGURA 11. Esquema de habituación a dos contextos con características físicas diferentes durante 5 días consecutivos. Las habituaciones a cada contexto estuvieron separadas por 90 minutos.

CONTROLES INTACTOS

En este protocolo en la fase de muestra 1 se presentan dos objetos distintos con el fin de que estos se vuelvan familiares y al mismo tiempo se asocian a un contexto específico. En la fase de muestra 2 se presenta un par de copias idénticas de uno de los objetos presentados en la fase de muestra 1 (objetos familiares) en el contexto donde no habían sido presentados (contexto 2), es importante mencionar que en esta fase tanto los objetos (familiarizados en la fase muestra 1) como el contexto (familiarizados durante 5 días en la habituación) son familiares la única información novedosa es la asociación entre el objeto y el contexto y es esta relación la que se evalúa con la

preferencia de exploración (ver figura 12). El tiempo de exploración de los objetos fue aumentado (10 minutos) en comparación con los protocolos estándar (3 minutos) con el objetivo de poder medir la memoria a largo plazo y de esta manera tener un protocolo en el cual se pudieran hacer manipulaciones para afectar la consolidación de la memoria. La manipulación farmacológica con este protocolo se puede realizar inmediatamente después de la fase de muestra 2 y de esta manera afectar sólo la consolidación de asociación novedosa entre el objeto y el contexto, sin afectar la consolidación de los objetos (consolidados en la fase de muestra 1) ni de los contextos (consolidados en la habituación).

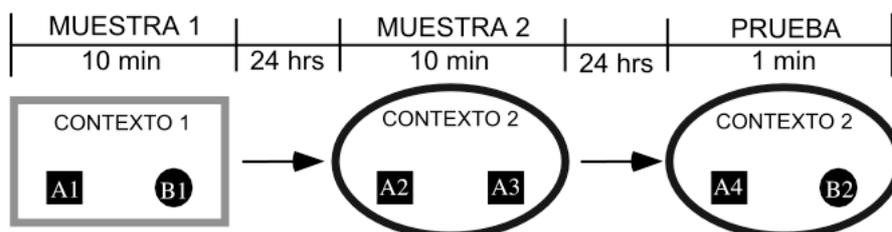


FIGURA 12. Protocolo de la tarea de reconocimiento de objeto en el contexto.

Los resultados muestran que los animales controles ($n = 15$) son capaces de discriminar el objeto que no se había presentado en ese contexto cuando se realiza la prueba de memoria a las 24 horas ($t_{(14)} = 3.21$, $p < 0.01$). Los animales no muestran preferencia por ninguno de los dos objetos durante la fase de muestra en el contexto 1 ($t_{(14)} = 1.17$, $p > 0.05$) ni en el contexto 2 ($t_{(14)} = 0.41$, $p > 0.05$) ver figura 13.

GRUPO CONTROL

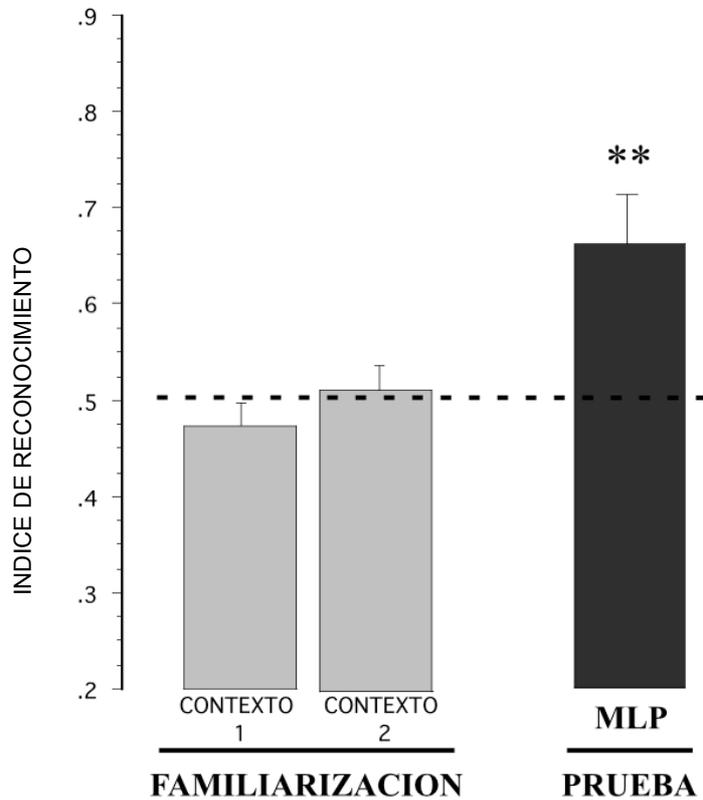


FIGURA 13. Ejecución de los animales controles en la fase de muestra y en la prueba memoria de 24 horas (MLP) para la tarea de reconocimiento de contexto. El índice de reconocimiento representa la proporción del tiempo de exploración del objeto nuevo [OBJETO NUEVO/ (OBJETO FAMILIAR + OBJETO NUEVO)]. La línea punteada representa el nivel de ejecución de azar [un índice de 0.5% indica que no hay preferencia por alguno de los objetos (**, $p < 0.01$)].

CONTROL DE FAMILIARIDAD

En el protocolo experimental diseñado para el reconocimiento de contexto uno de los objetos es presentado dos veces antes de la prueba de memoria, mientras el otro objeto sólo se presenta una vez. Por esta razón se diseñó un experimento para explorar la posibilidad de que uno de los dos objetos se volviera más familiar y esto repercutiera en la prueba de memoria.

En la fase de muestra 1, la rata se colocó en una de las 2 cajas (contexto 1) y se le permitió explorar libremente 2 objetos diferentes [un foco y un frasco (A_1 y B_1)] durante 10 minutos. La fase de muestra 2 se realizó 24 horas después. La rata se colocó en el contexto 2 que contenía 2 objetos idénticos [copias de uno de los objetos presentados previamente, ya sean dos focos o dos frascos (A_2 y A_3)] y se les permitió explorarlos libremente durante 10 minutos. La prueba de memoria se realizó 24 horas después (memoria de largo plazo) de la fase de muestra 2. Durante la prueba de memoria la rata se reintrodujo al contexto 1 y se le permitió explorar libremente durante 3 minutos una copia de los objetos previamente presentados en el contexto 1, (A_4 B_2) ver figura 14.

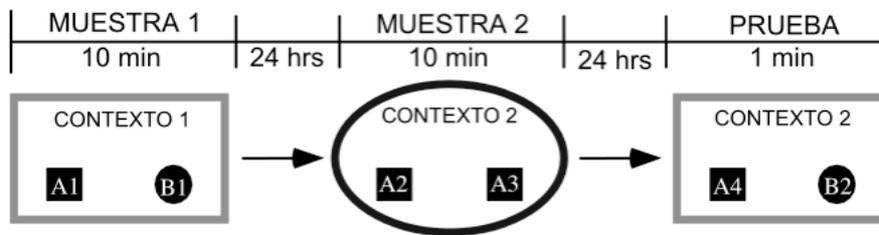


FIGURA 14. Protocolo del experimento de control de familiaridad.

Para el grupo de control de familiaridad ($n=6$) los resultados muestran que los animales no tienen preferencia por alguno de los objetos cuando se realiza la prueba a las 24 horas ($t_{(5)}=0.84$, $p>0.05$). Los animales tampoco muestran preferencia por ninguno de los dos objetos durante la fase de muestra en el contexto 1 ($t_{(5)}=0.31$, $p>0.05$) ni en el contexto 2 ($t_{(5)}=0.48$, $p>0.05$) ver figura 15.

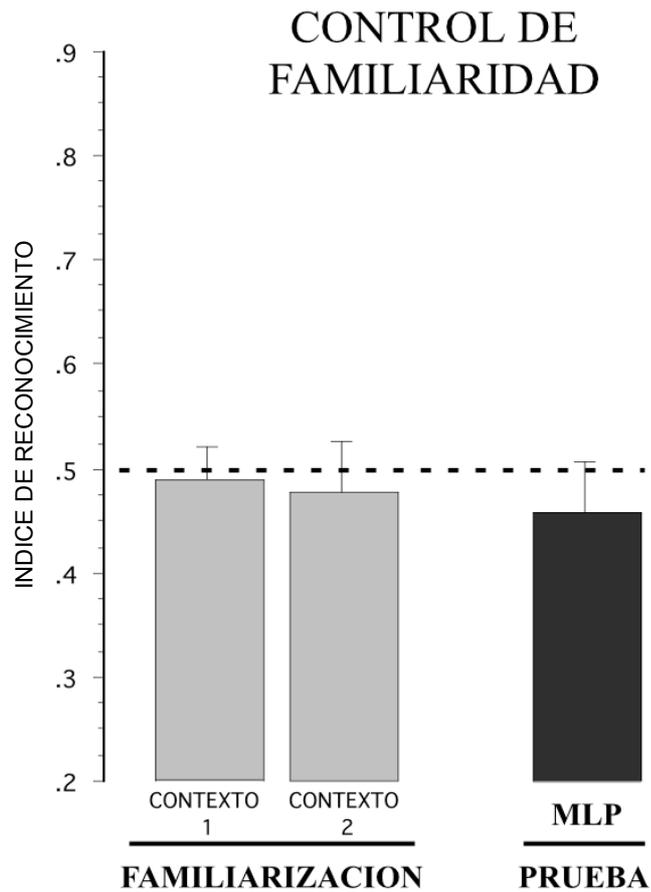


FIGURA 15. Ejecución de los animales controles en la fase de muestra y en la prueba memoria de 24 horas (MLP) para el protocolo de control de la familiaridad de los estímulos. El índice de reconocimiento representa la proporción del tiempo de exploración del objeto nuevo [OBJETO NUEVO/ (OBJETO FAMILIAR + OBJETO NUEVO)]. La línea punteada representa el nivel de ejecución de azar (un índice de 0.5% indica que no hay preferencia para alguno de los objetos).

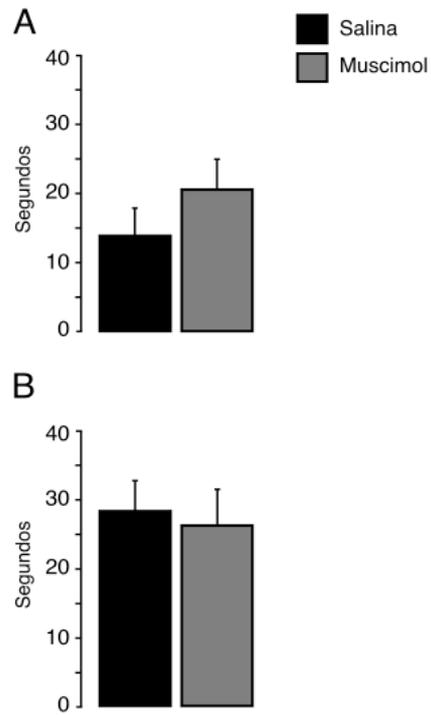


FIGURA 16. Tiempo total de exploración en los protocolos de reconsolidación (A) y actualización (B). Se observa un tiempo similar de exploración total a los objetos entre ambos grupos. Una prueba *t* no pareada mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos [$t(25) = 1.04$, $P = \text{NS (0.3)}$] en el experimento de reconsolidación; ni en el experimento de actualización [$t(32) = 0.29$, $P = \text{NS (0.76)}$].