



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EVENTOS MOLECULARES ASOCIADOS A LA  
EVOCACIÓN DE LA MEMORIA Y A LA EXTINCIÓN

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

SOFÍA GONZÁLEZ SALINAS

TUTOR: DR. ROBERTO A. PRADO ALCALÁ

Instituto de Neurobiología

JURIQUILLA, QUERÉTARO SEPTIEMBRE DE 2015



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.

Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por Sofía González Salinas cuyo título es “Eventos moleculares asociados a la evocación de la memoria y a la extinción” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biomédicas y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente	Dra. María Magdalena Giordano Loyola	_____
Secretario	Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá	_____
Vocal	Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia	_____
Vocal	Dra. María Isabel Miranda Saucedo	_____
Vocal	Dra. María Esther Olvera Cortés	_____

Aprobado por el Comité Académico

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de la presente tesis fue posible gracias a la ayuda, apoyo y aportaciones de las siguientes personas y dependencias a las cuales deseo expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá por siempre confiar en mi capacidad para desarrollar el presente proyecto y por compartir su experiencia como investigador

A la Dra. Gina Quirarte por estar al pendiente de mi desarrollo profesional y por sus oportunas sugerencias para enriquecer mi formación académica y personal

A la Dra. Anaid Antaramian por su apoyo para desarrollar el presente proyecto, por brindarme valiosas oportunidades para mejorar mi desarrollo profesional y por hacer agradable mi estancia en la Unidad de Proteogenómica

A la Dra. Andrea Cristina Medina Fragoso por ayudarme a realizar los experimentos y por su agradable compañía

A la MVZ. Norma Serafín por su agradable compañía y por compartir sus conocimientos en varias áreas profesionales

A la Mtra. Adriana González Gallardo y al Dr. Jorge Limón por transmitirme sus conocimientos en los experimentos de biología molecular y por su valioso tiempo para aclarar mis dudas

Al Mtro. Leopoldo González y a la Dra. Ofelia Mora por sus asesorías en el análisis de datos

Al Dr. Ellis Cooper por haber impulsado mi desarrollo como investigadora transmitiéndome su entusiasmo por la ciencia y por compartir su experiencia profesional

Al Sr. Ángel Mendez Olalde por el cuidado de los animales

A mis compañeros del laboratorio de Aprendizaje y Memoria que con su tiempo, sugerencias y amabilidad permitieron una agradable estancia en el laboratorio a lo largo de estos años (Miguel, Vera, Yavé, Karlita, Lucy, Viry, Eve, Clyo, Paola, Alex, Cris, Alhelí, Renata, Rafa, Martha, Rogelio, Antonio, Lupita, Lalo, Fanny, Odalis, Erika, Jazmín, Raúl e Inés)

A las siguientes personas de las unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología Campus UNAM-Juriquilla:

Bioterio: M.V.Z. José Martín García y Alejandra Castilla León

Cómputo: Ing. Ramón Martínez Olvera, Sandra Hernández García y Omar González

Videoconferencia: Lic. Lourdes Lara Ayala

Posgrado: Mtra. Leonor Casanova Rico

Al Capítulo Mexicano de la SfN por el apoyo brindado para asistir a los congresos de la SfN

A la International Brain Research Organization y al Ministro Brasileño de Ciencia y Tecnología en colaboración con la Universidad de Rio Grande do Norte por brindarme el apoyo para enriquecer mi formación académica mediante cursos en el extranjero

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para realizar mis estudios de doctorado a través de la beca (229335) y por el donativo de investigación del Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá (128259)

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el donativo de investigación al Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá (IN201415)

A la Universidad Nacional Autónoma de México que con sus opciones a nivel preparatoria, licenciatura y posgrado me ha permitido tener una formación de calidad internacional

## **DEDICATORIA**

A mi pequeña familia, Sergito y Zazil que cada día me llenan de amor, energías y motivación para cumplir mis metas

A mi madre Pilar por darme la oportunidad de vivir las bellas experiencias de mi educación y porque siempre me apoya en las decisiones que me permiten deleitarme con la ciencia

A mi padre José Manuel por procurar la mejor educación para mí y por estar siempre disponible para ayudarme

A mis hermanos Manuel, Gaby y Dany por alegrar mi existencia y aligerar siempre la carga académica

A mis abuelitas Vicky y Lola que siempre apoyaron mi educación y nunca dudaron que lograría grandes cosas en la vida

A todos mis tíos que con sus palabras de aliento me animan a esforzarme cada día más

A mis primos que siempre han confiado en mí para ser una mejor persona en todos los aspectos

A mi suegra Julia Moguel, que gracias a su apoyo he podido terminar esta etapa de estudiante

A mis amigos de las distintas etapas académicas y sociales que con sus palabras de motivación me recuerdan siempre que puedo lograr mis objetivos y que no debo olvidar divertirme (Iván, Jorge, Montse, Sinuhé, Ángel, José Luis, Adriana, Jessica, Priscila, Ricardo y Lilia)

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>3</b>
<b>5</b>	<b>MÉTODO GENERAL</b> .....	<b>3</b>
5.1	Animales .....	3
5.2	Cámara de entrenamiento .....	3
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTO 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DESPUÉS DE LA EVOCACIÓN</b> .....	<b>4</b>
6.1	Antecedentes.....	4
6.1.1	Evocación de la memoria.....	4
6.1.2	Elementos bioquímicos requeridos para evocar una memoria.....	6
6.1.3	Moléculas que se activan e inducen debido a la evocación de una memoria .....	14
6.1.3.1	Interacción entre genes de expresión temprana, ERK y receptores M1 .....	23
6.2	Justificación .....	34
6.3	Hipótesis .....	34
6.4	Objetivo general .....	35
6.5	Objetivos específicos .....	35
6.6	Método.....	35
6.6.1	Grupos experimentales.....	35
6.6.1.1	Experimento 1A .....	35
6.6.1.2	Experimento 1B .....	35
6.6.2	Tarea de evitación inhibitoria .....	36
6.6.3	Obtención de tejidos, extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	37
6.6.4	Diseño de oligonucleótidos .....	39
6.6.5	Preparación de reacciones de PCR.....	39
6.6.6	Condiciones del termociclador .....	40
6.6.7	Curvas de eficiencia.....	40
6.6.8	Elección de genes de referencia.....	41
6.6.9	Análisis estadístico .....	41
6.7	Resultados .....	42
6.7.1	Experimento 1A. Estudio de la expresión génica 90 min después de la prueba de evocación .....	42
6.7.1.1	Latencias conductuales .....	42
6.7.1.2	Curvas de eficiencia y elección del gen de referencia.....	43
6.7.1.3	Expresión génica en el estriado y la amígdala .....	45
6.7.2	Experimento 1B. Análisis temporal de la expresión génica en el estriado, amígdala e hipocampo después de la evocación .....	48
6.7.2.1	Latencias conductuales .....	48
6.7.2.2	Curvas de eficiencia y elección del gen de referencia.....	51
6.7.2.3	Curva temporal de expresión génica en el estriado .....	53
6.7.2.4	Curva temporal de expresión génica en la amígdala .....	56
6.7.2.5	Curva temporal de expresión génica en el hipocampo.....	58
6.7.2.6	Comparación entre los resultados obtenidos a los 90 min después de la evocación (Experimento1A) y la curva temporal de expresión (Experimento1B) .....	58
6.8	Discusión .....	61

<b>7</b>	<b>EXPERIMENTO 2. EFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS SOBRE LA EXTINCIÓN DE LA TAREA DE EVITACIÓN ACTIVA .....</b>	<b>69</b>
<b>7.1</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>69</b>
7.1.1	La evocación puede inducir extinción, reconsolidación o actualización de la información.....	69
7.1.2	Características de la extinción .....	70
7.1.3	Elementos bioquímicos requeridos para la extinción de una conducta .....	71
7.1.4	Reconsolidación y actualización de la información.....	76
<b>7.2</b>	<b>Justificación .....</b>	<b>78</b>
<b>7.3</b>	<b>Hipótesis .....</b>	<b>78</b>
<b>7.4</b>	<b>Objetivo.....</b>	<b>78</b>
<b>7.5</b>	<b>Método.....</b>	<b>79</b>
7.5.1	Tarea de evitación activa .....	79
7.5.2	Protocolo de extinción.....	79
7.5.3	Grupos experimentales.....	79
7.5.4	Tratamientos farmacológicos.....	80
7.5.5	Análisis estadístico .....	80
<b>7.6</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>80</b>
7.6.1	Administración de la CXM antes de la primera sesión de extinción .....	80
7.6.2	Administración de la CXM antes de la segunda sesión de extinción.....	84
7.6.3	Administración de la CXM antes de la tercera sesión de extinción .....	85
<b>7.7</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>97</b>
<b>11</b>	<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>98</b>
<b>12</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>98</b>
<b>13</b>	<b>ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO.....</b>	<b>112</b>



# 1 RESUMEN

La evocación es una etapa de la memoria mediante la cual corroboramos que una memoria fue almacenada de manera efectiva y convierte las memorias pasivas a activas. Durante esta etapa se induce la expresión génica y la síntesis de proteínas en diversas regiones cerebrales sin embargo la descripción a nivel molecular ha sido muy escasa. En la presente tesis evaluamos la expresión génica después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria y encontramos que la expresión de *arc* en el estriado y la expresión de *zif268* en la amígdala se inducen asociados a la evocación. La expresión de estos mismos dos genes en el hipocampo se indujo por la reexposición a la cámara de entrenamiento.

Asimismo la evocación inicia el proceso denominado extinción el cual modifica la conducta aprendida ya que provoca la disminución de la respuesta condicionada. Si bien se ha demostrado que el bloqueo de la expresión génica y de la síntesis de proteínas no afecta la evocación, la interferencia con estos procesos sí influye en la extinción. Como una segunda estrategia para estudiar los eventos celulares inducidos durante la evocación de la memoria y cómo éstos afectan el mantenimiento de una conducta aprendida, realizamos un bloqueo sistémico de la síntesis de proteínas durante la extinción en la tarea de evitación activa, ya que esta tarea nos permite estudiar de manera clara el establecimiento de la extinción. Encontramos que se puede retrasar la extinción sólo cuando un inhibidor de síntesis de proteínas es administrado antes de la primera reexposición al contexto de aprendizaje y cuando la intensidad de entrenamiento fue baja. Si la intensidad de entrenamiento es alta, sólo se interfiere con la extinción por poco tiempo. El bloqueo de la síntesis de proteínas durante la segunda o tercera reexposición no interfieren con la extinción independientemente de la intensidad empleada durante el entrenamiento.

## 2 ABSTRACT

The only effective and reliable way to know that a memory has been stored is through retrieval, which consists in exposing the animals to some of the elements that were present during training. Memory retrieval promotes the process termed extinction that produces a decrease in the conditioned response acquired during training. When an animal is reexposed to the learning context, omitting the usually aversive consequence, gene expression and protein synthesis are engaged in different brain regions. Although the blockade of gene expression and protein synthesis do not interfere with memory retrieval, these same treatments have an effect on extinction.

In the present work we analyzed gene expression after memory retrieval on the inhibitory avoidance task; we found that *arc* expression in the dorsal striatum and *zif268* expression in the amygdala are related to memory retrieval. The expression of these same genes in the hippocampus was induced by the reexposure to the learning context and not by the retrieval of the associations acquired during learning.

A second approach that we used to study the cellular processes activated by memory retrieval during the maintenance of the learned behavior was to block protein synthesis systemically during extinction. We found that a protein synthesis inhibitor affected extinction depending on the session when the treatment was administrated and on training intensity. Extinction was delayed only when the protein synthesis blocker was administrated before the first extinction session to animals trained with a low intensity. On the other hand, training with a higher intensity protected extinction against protein synthesis interference. The blockade of protein synthesis before a second or a third extinction session did not interfere with this process despite of training intensity.

### **3 INTRODUCCIÓN**

Atesoramos experiencias diarias que no sólo nos permiten adaptarnos y sobrevivir sino que dan un sentido de continuidad a nuestra vida. Estas experiencias diarias pueden dar lugar al aprendizaje que se refleja en una modificación de la conducta más o menos permanente. Para que el aprendizaje perdure y pueda ser utilizado posteriormente se debe almacenar en la memoria de largo plazo mediante un proceso denominado consolidación.

Así, la memoria consta de etapas denominadas adquisición (también referida como aprendizaje), consolidación y evocación; cada una de ellas posee características conductuales, bioquímicas y moleculares particulares. Durante la adquisición se obtiene la información por aprender, mediante la consolidación esta información se almacena y la evocación es el proceso que permite acceder a esa memoria. Sin embargo, la consolidación no representa la etapa final de una memoria, si una memoria es evocada la conducta aprendida puede ser modificada a través de la reconsolidación o la extinción.

A pesar de que el estudio de la evocación y la extinción se dio a la par del estudio de la consolidación, no han tenido la misma evolución sino hasta en décadas recientes. Una de las principales motivaciones del estudio de la evocación y la extinción es su entendimiento y la búsqueda de posibles procedimientos farmacológicos para tratar memorias formadas como consecuencia de eventos traumáticos. Para personas que han sufrido estrés post-traumático o que han adquirido una fobia, es de suma importancia controlar su miedo a esos eventos e interrumpir los pensamientos recurrentes relacionados a esa experiencia negativa. Por lo anterior es necesario conocer desde una perspectiva neurofisiológica y molecular no sólo cómo se adquieren y almacenan memorias negativas sino cómo se recuerda la información y como se extingue una conducta.

Para evocar una memoria se requiere de la participación de varios sistemas de neurotransmisión y de la actividad de distintas enzimas. A su vez, cuando se evoca una memoria se induce la expresión génica y la síntesis de proteínas en diversas regiones cerebrales tales como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal. Si bien se ha

demostrado que el bloqueo de la expresión génica y de la síntesis de proteínas no afecta la evocación, la interferencia con estos procesos influye en la extinción de la conducta, proceso iniciado por la evocación. Como podemos notar, los cambios moleculares que se inducen por la evocación tienen impacto en la extinción de una conducta, y por ello es relevante estudiar ambos procesos de manera conjunta.

Los estudios de expresión génica después de la evocación se han enfocado a analizar este proceso celular principalmente en el hipocampo y la amígdala; sin embargo otras regiones cerebrales que también participan en la evocación, como el estriado, no han recibido la misma atención. Por ello es de interés explorar los cambios en la expresión génica que se inducen por la evocación en el estriado, ya que esto permitirá tener una visión más amplia de las regiones activas después de la evocación que podrían estar involucradas en procesos subsecuentes tales como la extinción o la reconsolidación.

Referente a la síntesis de proteínas, una pregunta de investigación que ha sido contestada parcialmente es el papel de los inhibidores de la síntesis de proteínas en la extinción. Se ha encontrado que estos inhibidores pueden retrasar, acelerar o incluso no tener efecto sobre la extinción de una conducta aprendida. Se sugiere que estos diversos efectos se observan porque las condiciones de entrenamiento o de prueba son tales que generan una memoria débil o fuerte. Estas memorias con distinta fortaleza se inducen variando el número de sesiones de entrenamiento o de prueba, sin embargo no se han evaluado memorias generadas con distintas intensidades del estímulo incondicionado empleado durante el entrenamiento. El estudio de la inhibición de síntesis de proteínas durante la reactivación de memorias generadas con distintas intensidades de entrenamiento podría ayudar a esclarecer el efecto de los inhibidores de síntesis de proteínas en la extinción.

## **4 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la expresión génica después de la evocación y la participación de la síntesis de proteínas en la extinción.

## **5 MÉTODO GENERAL**

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

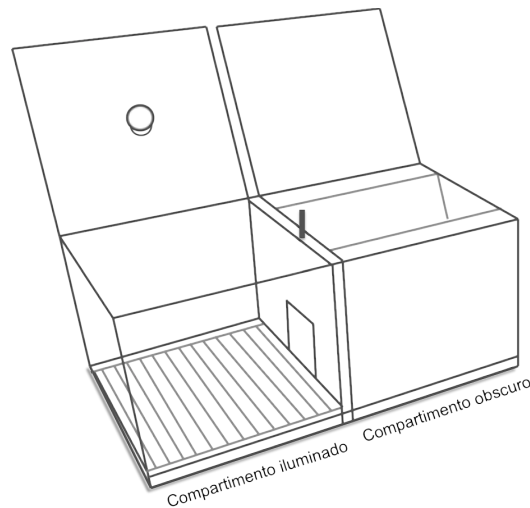
### **5.1 Animales**

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250-350 g al inicio del experimento. Los animales fueron alojados de manera individual teniendo acceso *ad libitum* a comida y agua. Se empleó un ciclo de luz/obscuridad de 12h/12h iniciándose a las 7:00 am. Todos los sujetos fueron manipulados durante 3 días previos al inicio del experimento por periodos de 3 min.

### **5.2 Cámara de entrenamiento**

Las tareas de evitación inhibitoria y de evitación activa se llevaron a cabo en una cámara con las características físicas descritas a continuación (Figura 1). El aparato consiste en dos compartimentos del mismo tamaño (30 x 30 x 30 cm), separados por una puerta en forma de guillotina. El primer compartimento está iluminado con un foco de 10 W localizado en el centro de la tapa; las paredes y tapa están hechas de acrílico color rojo mientras que el piso consiste en una rejilla construida con barras de acero inoxidable de 6 mm de diámetro, separadas entre sí por 9 mm. El otro compartimento no tiene iluminación; las paredes delantera y trasera así como el piso están hechos de placas de acero inoxidable mientras que las paredes laterales y la tapa son de acrílico color rojo. Las paredes metálicas y el piso de este compartimento tienen forma de “V” con una separación de 20 cm en la parte superior y de 8 cm en la parte inferior, conformando el piso. A lo largo

del piso hay una hendidura que tiene una separación de 1.5 cm, que separan las placas que conforman las paredes y piso; cuando la rata toca ambas placas cierra un circuito eléctrico. El choque se generó con un estimulador de pulsos cuadrados (Grass modelo S-48) conectado en serie con una unidad de corriente constante (Grass modelo CCU-1) que a su vez estaba conectada a las placas del compartimento no iluminado. La administración del choque y la medición de las latencias para cruzar entre compartimentos se llevaron a cabo de manera automatizada mediante un dispositivo programable (Schneider Electric modelo SR3B101FU). La cámara de entrenamiento se limpiaba con alcohol al 10% antes y después de que cada rata la ocupó; esta cámara estaba localizada en un cuarto oscuro sono-amortiguado, equipada con un generador de ruido blanco de fondo.



**Figura 1.** Cámara de entrenamiento empleada en las tareas de evitación inhibitoria y de evitación activa.

## **6 EXPERIMENTO 1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DESPUÉS DE LA EVOCACIÓN**

### **6.1 Antecedentes**

#### **6.1.1 Evocación de la memoria**

Una vez que una memoria ha sido consolidada, la única forma de corroborar su existencia es a través de un proceso denominado evocación. Así, la evocación es el proceso cognitivo que convierte las memorias pasivas a activas y permite la modificación de esa información almacenada (Dudai, 2004; Lewis, 1979; Wickelgren, Corbett, &

Dosher, 1980).

La evocación ha sido vista como un proceso de búsqueda similar al que llevan a cabo las computadoras; esta búsqueda parte de un espacio más o menos delimitado conocido como el conjunto de búsqueda (Tulving & Thomson, 1973). En el caso de una computadora el conjunto de búsqueda es el disco duro mientras que para una memoria este conjunto de búsqueda está constituido por memorias previas relacionadas a la situación actual y por las características específicas del contexto donde se evoca la memoria (Cammarota, Bevilaqua, Barros, et al., 2005; Tulving & Thomson, 1973). La efectividad para recuperar información depende sobre todo de que las claves presentes recapitulen algún aspecto de la memoria codificada (Tulving & Thomson, 1973).

La evocación es un proceso complejo ya que implica la salida de información almacenada y la rápida toma de decisiones; el sujeto debe extraer la información relacionada con el contexto actual y ejecutar la conducta más acorde a la situación (Tulving & Thomson, 1973).

Cada vez que recordamos una experiencia esta memoria es susceptible a integrar nuevos detalles que permitan tener una versión más completa de ese evento sin embargo en algunos casos se integran falsos detalles (Loftus & Pickrell, 1995). Diversos estudios han demostrado que la evocación es necesaria para modificar la información contenida en una memoria. Tronson, Wiseman, Olausson y Taylor (2006) mostraron que la aplicación de un inhibidor de la proteína cinasa A (PKA) en el núcleo basolateral de la amígdala desestabiliza la memoria de un condicionamiento de miedo al tono sólo cuando los sujetos que recibieron este tratamiento fueron reexpuestos al tono mientras que ningún efecto es observado en animales no reexpuestos y que recibieron el fármaco. De manera similar, Power, Berlau, McGaugh y Steward (2006), empleando el paradigma de evitación inhibitoria, mostraron que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas en el hipocampo interfiere con la conducta aprendida, evaluada en una prueba de memoria realizada posteriormente, sólo cuando los animales son reexpuestos a la cámara de entrenamiento, mientras que la conducta permanece intacta en animales que recibieron el tratamiento pero que permanecieron en su caja habitación. Los trabajos anteriores son solo algunos de los que apoyan la idea de que la evocación abre las puertas de la plasticidad para modificar una conducta aprendida.

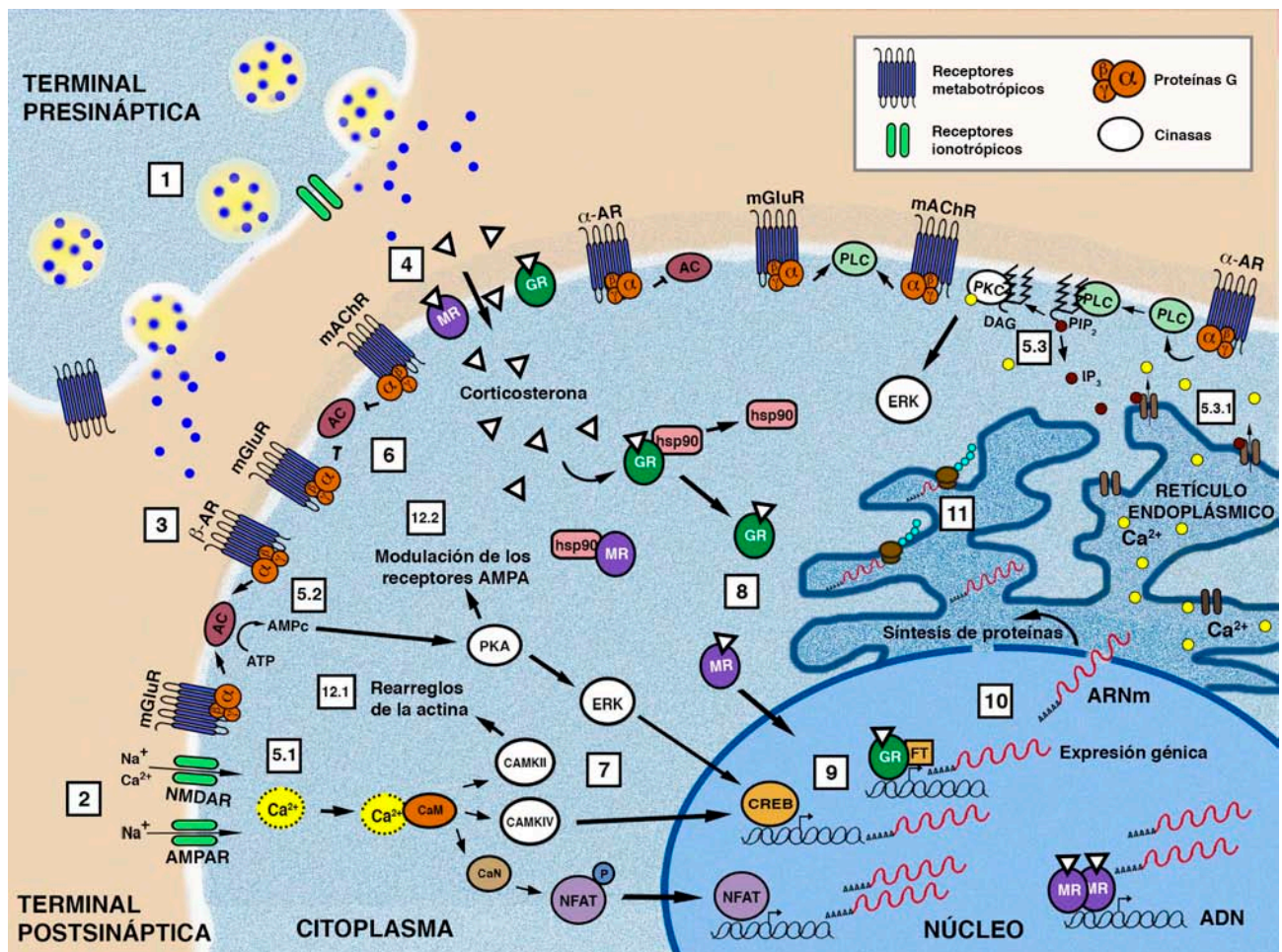
Asimismo la evocación convierte las memorias pasivas a activas con la posible finalidad de modificar de manera específica los activos. Usando un paradigma de condicionamiento de miedo al tono, ratas fueron entrenadas para que asociaran dos tonos diferentes con un choque eléctrico en las patas (Doyère, Dèbiec, Monfils, Schafe, & LeDoux, 2007). La administración de un inhibidor de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en la amígdala antes de la reexposición a uno de los tonos induce la debilitación de esa memoria, mientras que la respuesta condicionada al otro tono no reactivado permanece estable; el trabajo anterior muestra que la reactivación de una memoria específica induce sólo la modificación de esa a pesar de que haya elementos en común con otras memorias.

### 6.1.2 Elementos bioquímicos requeridos para evocar una memoria

Algunas de las estructuras cerebrales implicadas en la recuperación o evocación de la memoria son el hipocampo dorsal, la corteza parietal, la amígdala y el estriado dorsal. Dentro de los sistemas de neurotransmisión implicados en la evocación se encuentran el colinérgico, glutamatérgico, dopaminérgico y noradrenérgico.

Se ha estudiado ampliamente la participación de la región CA1 del hipocampo en el proceso de evocación. Mediante el uso de agonistas y antagonistas se ha encontrado que los receptores glutamatérgicos tipo AMPA y metabotrópicos de glutamato (AMPA y mGluR, respectivamente), dopaminérgicos (D1), noradrenérgicos ( $\beta$ -adrenérgico,  $\beta$ -AR) y muscarínicos colinérgicos (mACh) en esta región intervienen en la evocación de memorias generadas en diversas tareas como las de evitación inhibitoria, una tarea espacial alocéntrica, condicionamiento de miedo al contexto y al tono y el laberinto acuático (Barros et al., 2000, 2001; Bast, da Silva, & Morris, 2005; Murchison et al., 2004; Szapiro et al., 2000, 2001). Al interferir con estos mismos sistemas neuroquímicos en la corteza parietal también se produce un deterioro en la evocación (Barros et al., 2000, 2001). En la Figura 2 se muestran elementos celulares que participan en distintas etapas de la memoria; se hará referencia a esta imagen para localizar de una mejor manera el evento en cuestión y también para poder identificar su relación con distintas moléculas. De igual forma, en la Tabla I se resume la participación de distintos receptores y enzimas en la evocación, en la misma se puede comparar la participación de éstos en otras etapas de la memoria.





**Figura 2.** Eventos moleculares que participan en las etapas de la memoria. Diversos neurotransmisores son liberados de la terminal presináptica (1) y activan a sus correspondientes receptores ionotrópicos (2) o metabotrópicos (3) localizados principalmente en la terminal postsináptica. La hormona corticosterona atraviesa libremente la membrana celular y además activa receptores membranales (4). Los receptores membranales activados inician una señalización intracelular mediada por segundos mensajeros tales como el calcio (5.1), el AMPc (5.2), el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato ( $IP_3$ ) (5.3). El  $IP_3$  activa receptores localizados en el retículo endoplásmico que pueden liberar calcio hacia el citoplasma (5.3.1). Los receptores metabotrópicos interactúan con proteínas G, las cuales a su vez regulan la función de enzimas membranales como la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC) (6). Los segundos mensajeros activan diversas enzimas como PKA, PKC, ERK, CAMKII, CAMKIV, calmodulina (CaM) y calcineurina (CaN) (7). Los receptores a glucocorticoides (GR) y a mineralocorticoides (MR) permanecen inactivos en el citoplasma mediante su interacción con la proteína de choque térmico (hsp90); la unión de corticosterona los libera de esta interacción para permitir su translocación al núcleo (8). Los factores de transcripción (FT) como CREB y NFAT regulan la expresión de diversos genes (9); los correspondientes ARN mensajeros (ARNm) (10) son enviados al retículo endoplásmico donde serán traducidos a proteínas (11). Toda esta actividad intracelular induce rearrreglos en el citoesqueleto (12.1) y la modulación de receptores membranales como los AMPAR (12.2). Modificado de González-Salinas, Quirarte, Medina y Prado-Alcalá (en prensa).



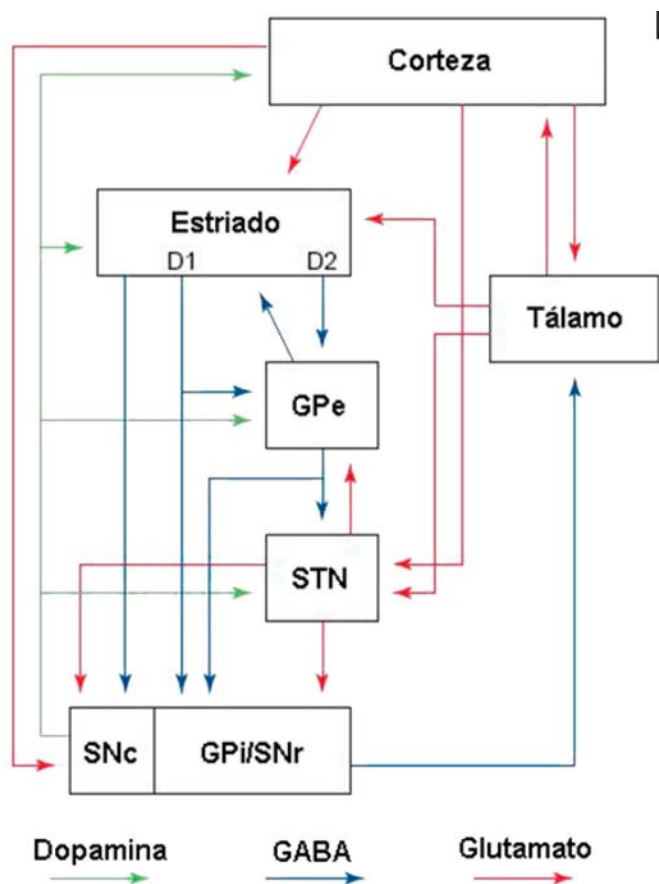
A pesar de los escasos estudios que existen, se ha demostrado que el estriado es otra de las estructuras implicadas en la evocación de la memoria. Antes de adentrarnos en este tema, mencionaremos las características generales del estriado. Éste es una estructura heterogénea no sólo en su neuroanatomía sino también en su funcionalidad, posteriormente mencionaremos los trabajos que demuestran su participación en la evocación. El estriado está compuesto principalmente (95%) por neuronas GABAérgicas de proyección conocidas como neuronas espinosas medianas; estas espinosas medianas reciben proyecciones glutamatérgicas de la corteza y de los núcleos intralaminares del tálamo (Tepper, Abercrombie, & Bolam, 2007). Las espinosas medianas reciben a su vez proyecciones GABAérgicas de otras espinosas medianas y de interneuronas estriatales (Tepper, Koós, & Wilson, 2004). Las interneuronas estriatales son menos abundantes que las espinosas medianas pero forman múltiples conexiones; un tipo de interneuronas, conocidas como interneuronas largas sin espinas, son colinérgicas y funcionan como marcapasos autónomos debido a su actividad tónica (Zhou, Wilson, & Dani, 2002). El resto de interneuronas del estriado son GABAérgicas y principalmente incluyen a las interneuronas de disparo rápido (fast-spiking) que expresan parvalbúmina y a las interneuronas de bajo umbral de disparo (low-threshold spiking) que expresan el neuropéptido Y (Tepper et al., 2004).

El glutamato, la dopamina, el GABA y la ACh modulan la actividad del estriado a través de receptores acoplados a proteínas G (Calabresi, Mercuri, De Murtas, & Bernardi, 1991; Sugita, Uchimura, Jiang, & North, 1991; Surmeier, Ding, Day, Wang, & Shen, 2007). Las sinapsis glutamatérgicas actúan principalmente a través de receptores AMPA para producir excitación sináptica rápida; los NMDA también contribuyen a la transmisión y plasticidad (Calabresi et al., 2000). La activación de receptores GABA<sub>B</sub>, receptores de ACh y metabotrópicos de glutamato tipo II y III inhiben la transmisión glutamatérgica en el estriado (Calabresi et al., 1991; Lovinger & McCool, 1995; Sugita et al., 1991); estos efectos parecen involucrar un decremento presináptico en la liberación de glutamato.

El estriado es la estructura de entrada de información proveniente de la corteza hacia los ganglios basales, esto mediado a través del neurotransmisor glutamato (**Figura 3**). A través de la vía directa de los ganglios basales, las neuronas espinosas medianas proyectan a los núcleos de salida de los ganglios basales (substantia nigra pars reticulata

y el globo pálido interno, principalmente), mientras que a través de la vía indirecta las espinosas medianas proyectan primero al segmento externo del globo pálido posteriormente al núcleo subtalámico y finalmente a los núcleos de salida (Grillner, Hellgren, Ménard, Saitoh, & Wikström, 2005). Mediante células GABAérgicas, los núcleos de salida inervan diversos núcleos blanco que incluyen al mismo tálamo (núcleos ventral anterior, ventral lateral e intralaminares), el núcleo pedúnculo pontino y el colículo superior. Debido a que las proyecciones de los núcleos de salida de los ganglios basales hacia el tálamo son de tipo GABAérgico, la activación de la vía directa del estriado hacia los núcleos de salida inhibe a las neuronas de la sustancia nigra pars reticulata y del globo pálido interno, teniendo por resultado la facilitación de la actividad motora. Por el contrario, la activación de la vía indirecta inhibe a las neuronas GABAérgicas del globo pálido externo lo que resulta en un incremento en la actividad de las neuronas glutamatérgicas excitatorias del núcleo subtalámico que a su vez activan a la sustancia nigra reticulada y al globo pálido, inhibiendo la función motora. (Grillner et al., 2005). En el estriado se observa una organización de las neuronas en parches y matriz, los parches están compuestos por células que reciben información límbica mientras que la matriz recibe principalmente información de tipo sensorial proveniente de la neocorteza (Nakano, Kayahara, Tsutsumi, & Ushiro, 2000). Las neuronas de los parches proyectan hacia la sustancia nigra pars compacta mientras que las células de la matriz proyectan hacia el globo pálido y hacia la sustancia nigra pars reticulata (Nakano et al., 2000).

Fenómenos como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) pueden ser observadas en las células del estriado, mismos que representan cambios funcionales en la sinapsis. La LTP estriatal requiere de la activación de receptores NMDA, de receptores D1 y de ACh; se sugiere que el principal tipo de receptor colinérgico involucrado es el M1 (Calabresi, Centonze, Gubellini, & Bernardi, 1999; Dang et al., 2006; Shen, Flajolet, Greengard, & Surmeier, 2008). La LTD requiere de la despolarización de la membrana y del potencial de acción de las células post-sinápticas durante la estimulación tetánica, la activación de receptores metabotrópicos de glutamato y la coactivación de receptores D1 y D2 (Calabresi, Maj, Pisani, Mercuri, & Bernardi, 1992).



**Figura 3.** Ganglios basales y sus conexiones neuronales. GPe: Globo Pálido externo; GPi: Globo Pálido interno; SNc: Substancia Nigra pars compacta; SNr: Substancia Nigra pars reticulata; STN: Núcleo subtalámico. Modificado de Gurney, Prescott, Wickens y Redgrave (2004).

Se propone que el estriado participa en distintos tipos de aprendizaje a través de tres circuitos, uno asociativo que involucra regiones corticales de asociación como la corteza prefrontal medial que proyecta al estriado dorsomedial en roedores y caudado en humanos; un circuito sensorimotor que implica las cortezas sensoriales y motoras y sus proyecciones hacia el estriado dorsolateral en roedores y putamen en humanos y un circuito límbico que implica la corteza límbica, la amígdala basolateral y el hipocampo que inervan el estriado ventral o núcleo accumbens (Yin & Knowlton, 2006; Yin, Ostlund, & Balleine, 2008). Así, el estriado dorsal, que recibe proyecciones dopaminérgicas de la substancia nigra pars compacta, parece participar principalmente en la generación de movimiento y en el aprendizaje. Por otra parte, el núcleo accumbens, que recibe proyecciones de estructuras límbicas y proyecciones dopaminérgicas del área tegmental ventral, constituye un componente principal de la vía mesolímbica jugando un papel

importante en la recompensa; lo anterior se ha demostrado mediante estudios donde se emplean drogas como reforzador y lesiones del núcleo accumbens. De manera más específica el estriado dorsolateral se relaciona con el aprendizaje instrumental o el aprendizaje estímulo-respuesta, esto mediado por sus conexiones con la corteza prelímbica (Groenewegen, Berendse, Wolters, & Lohman, 1990), mientras que la región dorsomedial se relaciona con las asociaciones acción-consecuencia que están presentes en el condicionamiento instrumental (Yin, Ostlund, Knowlton, & Balleine, 2005) y con el aprendizaje espacial (Lozano, Serafín, Prado-Alcalá, Roozendaal, & Quirarte, 2013; Packard & Knowlton, 2002).

El estriado ventral, que se divide en zona central y corteza (denominados comúnmente como core y shell por su traducción en inglés), se ha relacionado con el control motivacional de una acción donde se emplean reforzadores naturales como el alimento, la conducta sexual, con la locomoción y con los condicionamientos instrumental y pavloviano (Amalric & Koob, 1993; Corbit, Muir, & Balleine, 2001; Fenu, Bassareo, & Di Chiara, 2001; Kelley, 2004; Phillips, Setzu, & Hitchcott, 2003). De manera más específica la zona central del núcleo accumbens está implicada en el valor incentivo de las consecuencias en el condicionamiento instrumental mientras que la corteza se relaciona con el efecto estimulador de las claves que anticipan las recompensas en el condicionamiento instrumental (Corbit et al., 2001).

Se ha demostrado que el disparo neuronal en el estriado dorsomedial ocurre durante fases tempranas del entrenamiento conforme la ejecución mejora, una vez que el animal logra una asíntota en la conducta ahora el incremento en el disparo neuronal es observado en el estriado dorsolateral y disminuye en el estriado dorsomedial (Yin et al., 2009); este trabajo indica que el control en la ejecución de una tarea cambia del circuito asociativo hacia el circuito sensorimotor conforme la tarea se vuelve automatizada. La evidencia experimental indica que el estriado dorsal está implicado con la actividad motora y con el aprendizaje instrumental, pavloviano y aprendizaje espacial mientras que el estriado ventral está más relacionado con el valor de las consecuencias o de los estímulos en distintos tipos de condicionamiento. Por otra parte, en el estriado podemos encontrar principalmente receptores AMPA, NMDA, colinérgicos (M1), glutamatérgicos metabotrópicos del tipo II y III y dopaminérgicos D1 y D2; estos receptores participan en

los fenómenos de plasticidad sináptica, LTP y LTD, que se observan en las neuronas e interneuronas estriatales. Como veremos a continuación distintas moléculas liberadas en el estriado dorsal regulan el aprendizaje, entre ellas las hormonas del estrés glucocorticoides (Lozano et al., 2013).

Enfocándonos en la evocación se ha demostrado que lesiones en la región dorsolateral del estriado deterioran el procesamiento de información relacionada con las claves necesarias para evocar una memoria de discriminación visual (Botreau, El Massioui, Chéruef, & Gisquet-Verrier, 2004). Recientemente se ha encontrado que lesiones en el núcleo caudado de conejos impide la evocación en una tarea de condicionamiento palpebral; esta lesión también impide la mejoría en la ejecución que se logra aumentando el número de sesiones de entrenamiento (Flores & Disterhoft, 2013). Nuestro grupo de investigación ha reportado que la administración del antagonista colinérgico atropina en el estriado anterodorsal previo a la evocación en la tarea de evitación inhibitoria causa deterioro en la expresión de esta memoria (Prado-Alcalá, Fernández-Samblancat, & Solodkin-Herrera, 1985).

La exposición a un evento estresante antes de evocar una memoria causa un déficit en la recuperación de la información (de Quervain, Roozendaal, & McGaugh, 1998); esto pone de manifiesto que las moléculas liberadas durante el estrés tienen un papel activo en la evocación. Los glucocorticoides son moléculas esteroideas liberadas de la corteza adrenal debido a una situación de estrés, que activan receptores a glucocorticoides (GR) y a mineralocorticoides (MR); se ha encontrado que los glucocorticoides ejercen un efecto negativo en la evocación (Roozendaal, 2002). Se propone que la corticosterona, un subtipo de glucocorticoide, tiene efectos rápidos sobre la evocación a través de receptores membranales, mientras que también tiene efectos tardíos que dependen de la activación de receptores intracelulares que inciden en la expresión génica (Chauveau et al., 2010) (Figura 2: **4, 8**). El efecto negativo en la evocación que provoca la actividad de los GR del hipocampo es modulado por la actividad de los  $\beta$ -AR localizados tanto en la amígdala como en el hipocampo dorsal (Roozendaal, Hahn, Nathan, de Quervain, & McGaugh, 2004).

La actividad de algunas enzimas es necesaria durante la evocación y da inicio a una cadena de señalización que afectará procesos tardíos como la expresión génica y la

síntesis de proteínas. El bloqueo de la actividad de las enzimas PKA, de la proteína cinasa C (PKC) y de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) interfiere con la evocación de las tareas de condicionamiento de miedo al tono y de evitación inhibitoria (Huang, Chiang, Liang, Thompson, & Liu, 2010; Szapiro et al., 2000; Vianna et al., 2000) mientras que el bloqueo de la cinasa calcio/calmodulina II (CAMKII) no afecta la recuperación de la memoria (Szapiro et al., 2000) (Figura 2: **7**). Cabe mencionar que estas enzimas trabajan en una escala de minutos, en contraste con la actividad de receptores membranales o la de canales iónicos que ocurre en cuestión de milisegundos o pocos segundos. Por lo anterior parece contradictorio que la actividad lenta de las enzimas pueda influir en el proceso de evocación que ocurre de manera casi automática. Se ha sugerido que la interacción entre estas enzimas y los receptores de glutamato podría ser la causante de que la evocación sea afectada (Cammarota et al., 2004); la administración de un bloqueador de la actividad enzimática minutos previos a la evocación induciría un cambio en la interacción entre la enzima y los receptores glutamatérgicos que alteraría la actividad de éstos últimos y así se interferiría con la evocación.

Mediante el empleo de bloqueadores de la transcripción y de la síntesis de proteínas se ha demostrado que estos procesos no son requeridos para la evocación (Vianna, Igaz, Coitinho, Medina, & Izquierdo, 2003). Sin embargo, como mencionaremos más adelante, la expresión de genes y la síntesis de proteínas son inducidos por la evocación y afectan la extinción y reconsolidación que son procesos que se inician con la reactivación de una memoria. El estudio de las moléculas que se inducen después de evocar nos permitirá entender cuáles elementos podrían requerirse para modificar una conducta aprendida.

### 6.1.3 Moléculas que se activan e inducen debido a la evocación de una memoria

La evocación de una memoria induce la fosforilación de proteínas, la expresión de genes y la síntesis de nuevas proteínas. Se ha observado que la evocación aumenta la fosforilación de las enzimas CAMKII, PKA y ERK en el hipocampo y la amígdala minutos después de la reexposición al contexto o a alguna de las claves presentes el día del entrenamiento (Besnard, Laroche, & Caboche, 2013; Huang et al., 2010; Myskiw, Fiorenza, Izquierdo, & Izquierdo, 2010). La activación de receptores NMDA debido a la evocación causa la entrada de calcio a la célula, este segundo mensajero se adhiere a la



calmodulina, la cual activa a la CAMKII y a la calcineurina (Wang, Hu, & Tsien, 2006) (Figura 2: **5.1, 7**). Por otra parte, el incremento de AMPc causado por la actividad de receptores acoplados a proteínas G induce la actividad de PKA la cual puede activar a ERK (Abel et al., 1997). ERK es blanco de muchas cadenas de señalización y, además, al inducir la actividad de factores de transcripción como CREB, ERK propaga las señales iniciadas en la membrana celular para producir cambios en la expresión de genes y síntesis de proteínas que pueden provocar modificaciones neuronales a largo plazo tales como un mayor número de AMPAR membranales o la formación de nuevas espinas dendríticas (Peng, Zhang, Zhang, Wang, & Ren, 2010) (Figura 2: **9**). Entonces, los cambios observados en la fosforilación de CAMKII, PKA y ERK después de la evocación podrían indicar que durante la evocación se inicia la actividad de vías de señalización que culminarán con la inducción de la expresión de genes y con cambios morfológicos que alterarán la actividad neuronal.

Otros estudios han demostrado que la evocación induce actividad en el núcleo neuronal (Figura 2: **9 y 10**). En el núcleo se localiza el material genético que da identidad a toda célula, esta información genética es heredable y estable a lo largo de la vida de un individuo. La información genética localizada en el núcleo conforma el genoma de un organismo cuyo componente bioquímico es el Ácido Desoxirribonucleico (ADN). A su vez, la unidad funcional de un genoma es el gen que contiene la información necesaria para producir una proteína. En la síntesis de una proteína, el gen correspondiente es transcrito a otro lenguaje donde se produce un Ácido Ribonucleico del tipo mensajero (ARNm) que a su vez es traducido por los ribosomas para producir una proteína. La expresión génica se refiere al proceso mediante el cual la información contenida en un gen es transformada a un lenguaje de nucleótidos de ARN; la expresión de un gen requiere de la actividad de diversas proteínas entre ellas la ARN polimerasa y de factores de transcripción. Existen genes cuya expresión ocurre de manera constitutiva en la célula mientras que hay otros que se mantienen reprimidos por distintos elementos celulares hasta que alguna estimulación de tipo bioquímico produce cambios en su región promotora que libera la zona de inicio de la transcripción. La estructura secundaria de un gen está dada por las proteínas histonas que envuelven al ácido nucleico conformando la cromatina la cual es susceptible a modificaciones post-traduccionales que la hacen accesible o impermeable a la actividad de factores de transcripción influyendo así en la expresión de ese gen. Se ha

observado un incremento en la fosforilación tanto de la histona H3 como de la enzima MSK1 en el giro dentado del hipocampo después de la evocación en un condicionamiento de miedo al contexto (Besnard et al., 2013). ERK regula la fosforilación de la histona H3 a través de la actividad de la enzima MSK1; la fosforilación tanto de H3 como de MSK1 está asociada a la expresión génica (Day & Sweatt, 2011). Después de la evocación se ha encontrado que se induce la expresión de los genes de expresión temprana *arc*, *c-fos*, *zif268* y de los genes *sgk1* y *sgk3* (Hall, Thomas, & Everitt, 2001a; Thomas, Hall, & Everitt, 2002; VanElzakker et al., 2011; von Herten & Giese, 2005; Yamasaki, Hashikawa, Matsuki, & Nomura, 2012). La expresión de estos genes producida por la evocación se ha observado en la amígdala, el hipocampo y en la zona central del núcleo accumbens (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Los cambios en la expresión génica bservados en la amígdala después de la evocación de diversas tareas que poseen un componente de miedo, tales como el condicionamiento de miedo al contexto y al tono y el laberinto acuático en su versión espacial, sugieren que la evocación del miedo asociado a un contexto induce la actividad neuronal en la amígdala (Hall et al., 2001a). Por otra parte, los cambios en expresión génica en el hipocampo se han observado en tareas cuyo componente principal es de tipo contextual, como el laberinto acuático en su versión espacial y el condicionamiento de miedo al contexto (Hall et al., 2001a; VanElzakker et al., 2011; von Herten & Giese, 2005), mientras que no se observan cambios en tareas como el condicionamiento de miedo al tono donde la clave visual o auditiva es el elemento más importante durante la evocación (Hall et al., 2001a). Los trabajos anteriores muestran que el hipocampo no sólo está involucrado en la consolidación de memorias que poseen un componente contextual como se ha postulado hace ya varios años (Sanders, Wiltgen, & Fanselow, 2003) sino que también su actividad se requiere para evocar la información del contexto.

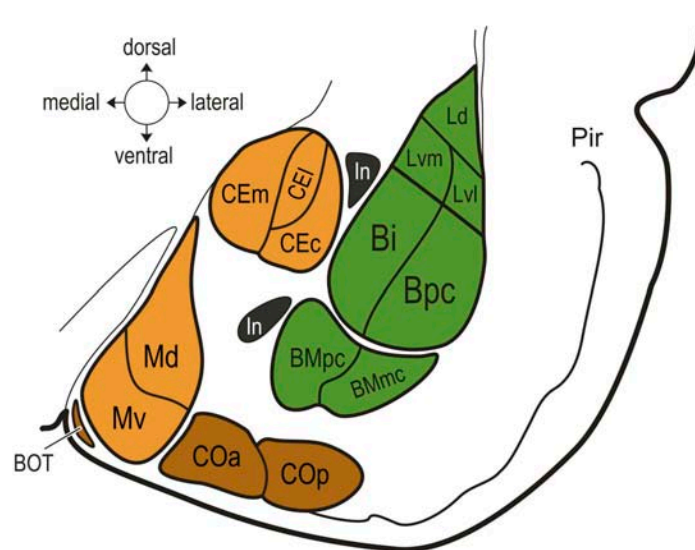
**Tabla II. Estudios en los que se han observado incrementos en la expresión génica después de la evocación**

Gen	Estructura cerebral	Tiempo (min)	Técnica	Especie	Tarea	Referencia
<i>arc</i>	Amígdala (LA)	0 y 30	FISH	Ratón	CMC	Yamasaki et al. (2012)
<i>c-fos</i>	Amígdala (BLA)	30	ISH	Rata	LAc	VanElzakker et al. (2011)
	Hipocampo (CA1)	30	ISH	Rata	LAc	VanElzakker et al. (2011)
<i>sgk1, sgk3</i>	Hipocampo dorsal	60	PCR en Tiempo Real	Ratón	CMC "b"	von Herten, y Giese (2005)
	Amígdala (B, LA, Ce)	30	ISH	Rata	CMC	Hall et al. (2001a)
	Amígdala (B, LA, Ce)	30	ISH	Rata	CMT	Hall et al. (2001a)
<i>zif268</i>	Núcleo Accumbens (core)	30	ISH	Rata	CMC	Thomas et al. (2002)
	Núcleo Accumbens (core)	30	ISH	Rata	CMT	Thomas et al. (2002)
	Hipocampo (CA1)	30	ISH	Rata	CMC	Hall et al. (2001a)

LA= Lateral, BLA= Basolateral, B= Basal, Ce= Central. FISH= Hibridación *in situ* con Fluorescencia, ISH= Hibridación *in situ*. CMC= Condicionamiento de miedo al contexto, LAc= Laberinto Acuático con plataforma oculta, CMC "b"= Condicionamiento de miedo al contexto "background" , CMT= Condicionamiento del miedo al tono.

Como podemos percatarnos la amígdala y el hipocampo son dos de las estructuras ampliamente implicadas en la evocación de la memoria, por ello haremos alusión a su neuroanatomía antes de proseguir con más hallazgos experimentales que las implican. La amígdala está compuesta principalmente por tres grupos de núcleos, el basolateral (núcleos lateral, basal y basomedial), centromedial (núcleos central y medial) y el superficial o tipo corteza (núcleos corticales anterior y posterior, núcleo del tracto olfativo y corteza periamigdalóide) (**Figura 4**). Las principales entradas de información que recibe la amígdala llegan a través de la estria terminalis. La amígdala recibe información sensorial proveniente de la corteza olfativa y de las vías ascendentes viscerales, asimismo la amígdala modula funciones viscerales relacionadas con el significado emocional de los estímulos externos e internos. La amígdala también regula conductas emocionales y respuestas motoras a través de la vía amigdalofugal ventral que la conecta con las áreas corticales frontal ventromedial, rostral insular, rostral temporal, con el tálamo medial y con los ganglios basales ventromediales (Knapska, Radwanska, Werka, & Kaczmarek, 2007). Los núcleos de la amígdala se constituyen principalmente por neuronas piramidales o de proyección (95%) y por interneuronas locales (5%). Las neuronas de proyección de la amígdala son glutamatérgicas mientras que las interneuronas de la amígdala son GABAérgicas. La acetilcolina, la noradrenalina, el glutamato, la serotonina y los opioides

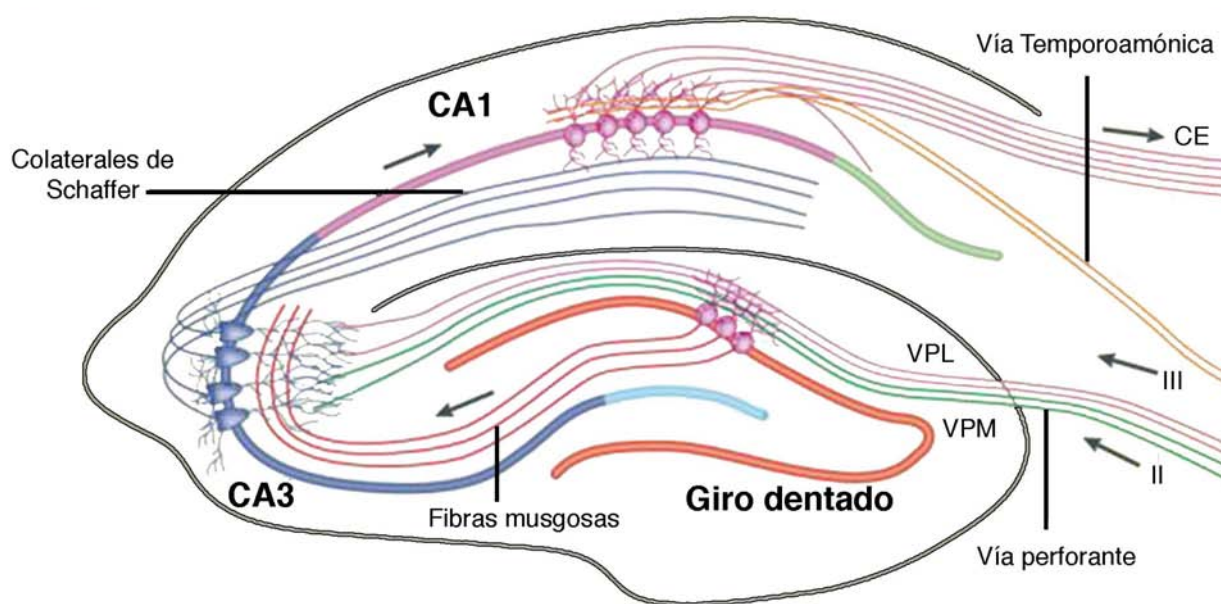
modulan la actividad de las neuronas de la amígdala (Sah, Faber, Armentia, & Power, 2003).



**Figura 4.** Principales núcleos de la amígdala y sus subdivisiones. In: núcleos intercalados ;CEc: núcleo central subdivisión central; CEI, núcleo central subdivisión lateral; CEm: núcleo central subdivisión medial; COa, núcleo cortical, subdivisión anterior; Cop: núcleo cortical subdivisión posterior; BOT: núcleo de la cama del tracto olfativo; Bi: núcleo basal subdivisión intermedia; Bpc: núcleo basal subdivisión parvovelular; BMmc: núcleo basomedial subdivisión magnocelular; BMpc: núcleo basomedial, subdivisión parvocelular; Ld: núcleo lateral subdivisión dorsal; Lvm: núcleo lateral subdivisión ventromedial; Lvl: núcleo lateral subdivisión ventrolateral; Md: núcleo medial subdivisión dorsal; Mv:, núcleo medial subdivisión ventral; Pir: corteza piriforme. (Knapska et al., 2007).

La formación hipocámpal comprende al hipocampo, giro dentado, complejo subicular y corteza entorrinal. A su vez el hipocampo se divide en tres campos principales denominados CA1, CA2 y CA3 (CA: Cuerno de Amón) (Figura 5). Las regiones CA1-CA3 se conforman por células piramidales organizadas en una sola capa mientras que el giro dentado no contiene células piramidales sino que contiene una alta densidad de células granulares pequeñas; en las diferentes regiones de la formación hipocámpal hay interneuronas (Spiers, 2012). La comunicación en la formación hipocámpal ocurre a través de conexiones glutamatérgicas. El hipocampo recibe información de la amígdala, de la corteza prefrontal, del septum medial, del tálamo y del hipotálamo a través de la corteza entorrinal y del fórnix. El giro dentado recibe información de la corteza entorrinal a través de la vía perforante. La vía perforante conecta a su vez a la corteza entorrinal con el

subiculum y con la región CA3 del hipocampo, de manera menos densa también la corteza entorrinal se contacta con la región CA1. La vía de las fibras musgosas está constituida por células que proyectan de manera exclusiva del giro dentado a CA3. Las células de CA3 proyectan a otras regiones del mismo CA3, a CA1 y regiones subcorticales. CA3 constituye la mayor entrada de información de CA1 mediante las colaterales de Schaffer (Spiers, 2012). CA1 proyecta al subiculum y el subiculum se conecta finalmente con la corteza entorrinal. La corteza entorrinal proyecta a cortezas de asociación polimodal, a regiones adyacentes como la corteza perirrinal, la corteza parahipocampal y hacia regiones lejanas como la corteza orbitofrontal (Schultz & Engelhardt, 2014). La formación hipocampal recibe inervación colinérgica (núcleo basal de Meynert), dopaminérgica (área tegmental ventral), adrenérgica (locus coeruleus) y serotoninérgica (núcleos de Raphé) (Thompson et al., 2008).



**Figura 5** Vías de comunicación neuronal en la formación hipocámpica. CE: Corteza Entorrinal; VPL: Vía Perforante Lateral; VPM: Vía Perforante Medial. Modificado de Deng, Aimone y Gage (2010).

La síntesis de proteínas correspondiente a genes de expresión temprana también se induce por la evocación (Figura 2: 11). Arc, c-Fos, JunB y Zif268 aumentan después de la prueba de memoria en tareas como el condicionamiento de miedo al tono y al contexto y en la tarea de evitación inhibitoria (Besnard et al., 2013; Cheval et al., 2012, 2012; Frankland, Bontempi, Talton, Kaczmarek, & Silva, 2004; Fukushima et al., 2014; Hall, Thomas, & Everitt, 2001b; Kwon, Jhang, Kim, Lee, & Han, 2012; Lee, Everitt, & Thomas,

2004; Maddox, Monsey, & Schafe, 2011; Maddox & Schafe, 2011; Mamiya et al., 2009; Strekalova et al., 2003). Los incrementos en las proteínas ya mencionados se han observado en diversas estructuras como la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal en un rango de entre 30 y 120 min después de exponer nuevamente a los sujetos al contexto de entrenamiento o a alguna de las claves presentes durante la adquisición. Se ha encontrado que debido a la evocación no sólo se induce la síntesis de proteínas correspondiente a genes de expresión temprana, el receptor colinérgico M1 aumenta en el hipocampo, en el estriado y en la corteza temporo-parietal después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria en animales que fueron entrenados con una intensidad baja de choque eléctrico. Si los animales son entrenados con una intensidad mayor el aumento en M1 es observado en la amígdala y en la corteza temporo-parietal (Ortega, Díaz del Guante, Prado-Alcalá, & Alemán, 1996) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

Se ha encontrado que los cambios en la fosforilación, expresión génica y síntesis de proteínas inducidos después de la evocación son de menor magnitud que aquellos observados después del aprendizaje. Besnard et al. (2013) mostraron que los cambios en la fosforilación de ERK en la región CA1 y la amígdala y el aumento de las proteínas Arc y c-Fos en el giro dentado después de la evocación son menores que aquellos observados después del entrenamiento en el condicionamiento de miedo al contexto. Los autores proponen que esto podría ser explicado por la diferencia de estímulos presentes en las distintas etapas de la memoria (aprendizaje: choque eléctrico + contexto; evocación: no choque + contexto). Asimismo, el trabajo de Montag-Sallaz y Montag (2003) en el que se analizó el ARNm de *arc* mostró que el cambio inducido después de la adquisición de una memoria de evitación es mayor que el observado después de evocar la conducta aprendida. Los trabajos anteriores sugieren que la evocación no es una recapitulación del aprendizaje sino que sólo se inducen cambios discretos al reactivar esa memoria. Sin embargo hay trabajos que demuestran que después del entrenamiento y después de la evocación se activa una proporción muy similar de neuronas; incluso mediante el uso de técnicas moleculares en animales transgénicos se ha encontrado que las neuronas que se activaron durante el entrenamiento tienen una probabilidad muy alta de ser las mismas que se reactivan durante la evocación (Guzowski, McNaughton, Barnes, & Worley, 1999; Reijmers, Perkins, Matsuo, & Mayford, 2007). A pesar de las diferencias en las técnicas

empleadas en los estudios anteriores, lo que sugieren estos trabajos en conjunto es que durante la evocación las neuronas que participaron durante el entrenamiento se activan nuevamente durante la evocación y que la reactivación de estas neuronas produce menores niveles de fosforilación, de expresión de genes y de síntesis de proteínas que los generados después del entrenamiento.

**Tabla III. Estudios en los que se han observado incrementos en proteínas después de la evocación**

Proteína	Estructura cerebral	Tiempo (min)	Técnica	Especie	Tarea	Referencia
Arc	Amígdala (LA, BLA, Ce)	90	IH	Ratón	CMC	Mamiya et al. (2009)
	Amígdala (LAv, LAd)	120	WB, IH	Rata	CMT	Maddox, y Schafe (2011)
	Hipocampo (CA1, CA3)	90	IH	Ratón	CMC	Mamiya et al. (2009)
	Hipocampo (giro dentado)	30	IH	Ratón	CMC	Besnard et al. (2013)
	Corteza Prefrontal medial (IL, PL)	90	IH	Ratón	CMC	Mamiya et al. (2009)
c-Fos	Amígdala (B)	60	IH	Rata	CMT	Hall et al. (2001b)
	Amígdala (LA, B)	90	IH	Ratón	EI	Fukushima et al. (2014)
	Hipocampo (CA1, CA3)	90	IH	Ratón	EI	Fukushima et al. (2014)
	Hipocampo (CA1)	90	IH	Ratón	CMC	Strekalova et al. (2003)
	Hipocampo (CA1)	90	IH	Ratón	CMC	Frankland et al. (2004)
	Hipocampo (CA1)	120	WB	Rata	EI	Cheval et al. (2012)
	Hipocampo (giro dentado)	30	IH	Ratón	CMC	Besnard et al. (2013)
	Corteza Prefrontal medial (IL, PL)	90	IH	Ratón	EI	Fukushima et al. (2014)
JunB	Hipocampo (CA1)	90	IH	Ratón	CMC	Strekalova et al. (2003)
M1	Estriado	150	Binding	Rata	EI	Ortega et al. (1996)
	Hipocampo (dorsal y ventral)	150	Binding	Rata	EI	Ortega et al. (1996)
Zif268	Amígdala (LA)	90	IH	Ratón	CMT	Kwon et al. (2012)
	Amígdala (LAv, LAd)	120	IH	Rata	CMT	Maddox et al. (2011)
	Hipocampo (CA1)	90	IH	Ratón	CMC	Frankland et al. (2004)
	Hipocampo (CA1)	120	WB	Rata	CMC	Lee et al. (2004)
	Hipocampo (CA1)	120	WB	Rata	EI	Cheval et al. (2012)
	Hipocampo (giro dentado)	15, 30 y 60	IH	Ratón	CMC	Besnard et al. (2013)
	Hipocampo (giro dentado y CA3)	120	WB	Rata	CMC	Lee et al. (2004)

LA= Lateral, BLA= Basolateral, Ce= Central, LAv= Lateral ventral, LAd= Lateral dorsal, IL= Infralímbica, PL= Prelímbica.  
 IH = Inmunohistoquímica, WB= Western Blot. CMC= Condicionamiento de miedo al contexto, CMT= Condicionamiento del miedo al tono, EI= Evitación inhibitoria "step through".

Los cambios en la fosforilación y síntesis de proteínas son observados a distintos tiempos después de la evocación dependiendo de la estructura cerebral. Besnard et al. (2013) reportaron que los niveles de fosforilación de la proteína ERK aumentan inmediatamente después de la evocación en el giro dentado, mientras que este cambio es observado hasta los 30 min en la región CA1 y en las regiones basolateral y central de la

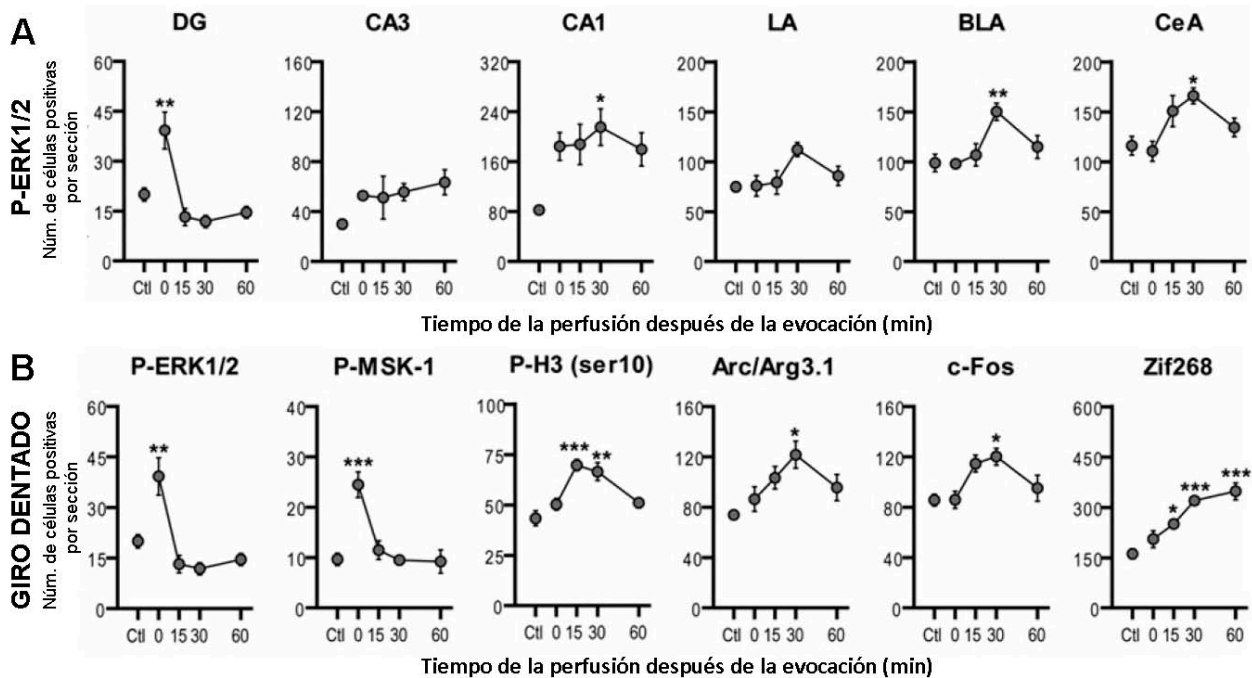
amígdala. En el giro dentado encontraron que las proteínas Arc y c-Fos aumentan a los 30 min después de la evocación mientras que la proteína Zif268 aumenta desde los 15 min y se mantiene incrementada hasta los 60 min (Figura 6). Estos resultados sugieren que la evocación induce actividad neuronal primero en el giro dentado y que posteriormente se activan la región CA1 y la amígdala. Además, nos indican que la síntesis de las proteínas Arc y c-Fos decrece rápidamente después de la evocación mientras que la síntesis de Zif268 es sostenida posiblemente hasta las 2 h después de la evocación como lo mostrado previamente por Lee et al. (2004).

Los cambios moleculares observados después de la evocación también dependen del tiempo que dura la prueba de evocación y del número de sesiones. Se ha observado que una reexposición breve al contexto donde se aprendió (5 min) induce la síntesis del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) en el hipocampo, mientras que si esta reexposición es prolongada (30 min) ya no se observan cambios (de la Fuente, Freudenthal, & Romano, 2011). Por otra parte, los niveles de la calcineurina en la región basolateral de la amígdala aumentan sólo cuando los animales son reexpuestos al contexto de aprendizaje por 10 sesiones, mientras que una sola reexposición no provoca cambios (Merlo, Milton, Goozee, Theobald, & Everitt, 2014). De la Fuente et al. (2011) proponen que una reexposición breve induce la actividad de NF- $\kappa$ B que redundaría en la expresión de un conjunto específico de genes; si la reexposición se prolonga entonces se activa la fosfatasa calcineurina y se bloquea la actividad de NF- $\kappa$ B. La calcineurina puede activar a su vez al factor de transcripción NFAT (factor nuclear de las células T activadas) y así inducir la expresión de otro conjunto de genes. Entonces, la reexposición breve o prolongada al contexto conlleva a la expresión de genes y síntesis de proteínas cuya identidad podría ser diferente en cada caso.

Asimismo los cambios moleculares inducidos por una reexposición breve o prolongada también dependen de la estructura cerebral en estudio. Una reexposición breve al contexto de aprendizaje (3 min) aumenta los niveles de fosforilación del factor de transcripción CREB (pCREB) y de la proteína Arc en el hipocampo dorsal (Mamiya et al., 2009). Cuando la reexposición es larga (30 min), el aumento en pCREB y Arc se observa en la corteza prefrontal. En la amígdala el tiempo de reexposición parece no influir en la



inducción de pCREB y Arc ya que ambos protocolos inducen incrementos (Mamiya et al., 2009).



**Figura 6.** Cambios en la fosforilación y síntesis de proteínas después de la evocación en el condicionamiento de miedo al contexto. **A.** Fosforilación de ERK en el hipocampo (DG, CA3 y CA1) y la amígdala (LA, BLA y CeA). **B.** Fosforilación de ERK, de MSK-1, y de H3, síntesis de las proteínas Arc, c-Fos y Zif268 en el giro dentado. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs Ctl. Modificada de Besnard et al. (2013).

### 6.1.3.1 Interacción entre genes de expresión temprana, ERK y receptores M1

Como podemos observar en la [Figura 6](#), no se encuentra el origen de la referencia. y [REF \\_Ref291367707](#) no se encuentra el origen de la referencia., los genes y proteínas que se han estudiado después de la evocación corresponden principalmente a genes de expresión temprana aunque, como mencionaremos posteriormente, también se ha encontrado que el receptor muscarínico M1 aumenta sus niveles. Los genes de expresión temprana (IEGs, por sus siglas en inglés) son definidos así porque se inducen poco tiempo después de un evento de actividad neuronal y porque su expresión no requiere de la síntesis de nuevas proteínas; es decir, se expresan aún en la presencia de inhibidores de síntesis de proteínas (Miyashita, Kubik, Lewandowski, & Guzowski, 2008;

Okuno, 2011). Los IEGs pueden clasificarse en genes efectores y en genes reguladores (Clayton, 2000). Entre los genes efectores están incluidos aquellos que van a incidir de manera directa y relativamente rápida en la actividad neuronal mediante la relocalización membranal de receptores AMPA, la citoarquitectura neuronal o la localización sináptica de ARNm; algunos ejemplos de genes efectores son *arc* (proteína de citoesqueleto regulada por actividad), *homer1a*, *tpa* (activador tisular de plasminógeno), *narp* (pentraxina neuronal regulada por actividad) y *bdnf* (factor neurotrófico derivado del cerebro) (Miyashita et al., 2008). Por otra parte, los genes reguladores se refieren a factores de transcripción que van a regular la expresión de otros genes, dentro de ellos podemos encontrar a *c-fos*, *c-jun*, *junb* y *zif268* (Miyashita et al., 2008).

El estudio de IEGs ha recibido gran atención en años recientes ya que su expresión se induce por manipulaciones conductuales o por estimulaciones *in vitro* que promueven la actividad de las neuronas. Entre los eventos que inducen la expresión de IEGs se encuentran diferentes etapas de la memoria como la evocación (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), el modelo *in vitro* de plasticidad sináptica LTP (Cole, Saffen, Baraban, & Worley, 1989; Wisden et al., 1990; Worley et al., 1993) y la exposición a ambientes novedosos (Guzowski et al., 2006; Vazdarjanova, McNaughton, Barnes, Worley, & Guzowski, 2002).

La amplia caracterización de algunos IEGs como *arc*, *homer1a* y *zif268* ha permitido conocer con gran precisión la dinámica temporal de síntesis de su ARNm y su correspondiente proteína después de un evento de actividad neuronal; estas características han dado pie al desarrollo de distintas técnicas que permiten diferenciar la actividad neuronal asociada a dos eventos diferentes (Guzowski et al., 2005; Miyashita et al., 2008; Zangenehpour & Chaudhuri, 2005). El ARNm de *arc* localizado en el núcleo permite identificar aquellas células que se activaron en los ~ 5 min previos al sacrificio de los animales mientras que el ARNm localizado en el citoplasma nos indica que esas células se activaron 30 min antes (Miyashita et al., 2008). Por otra parte, es posible marcar en un mismo tejido el ARNm y la proteína de *zif268*; con ello se puede identificar que la marca del ARNm corresponde a las células que se activaron 30 min previos y el marcaje de la proteína a aquellas células activadas 90 min antes del sacrificio de los animales (Zangenehpour & Chaudhuri, 2005). Incluso se ha tomado ventaja de la dinámica de

distintos genes para que su análisis en conjunto permita identificar la activación entre dos eventos; empleando marcadores del ARNm de *arc* se pueden identificar las células que estuvieron activas 2-15 min previos y con marcadores para el ARNm de *homer1a* a aquellas activas 25-40 min previos, la evaluación de la expresión de estos dos genes permite diferenciar con mayor precisión un evento de otro ya que la expresión temporal de *homer1a* no se sobrepone con la expresión de *arc* (Guzowski et al., 2005).

Sin embargo, algunos estudios indican que los cambios en la actividad eléctrica neuronal no siempre correlacionan con la inducción de IEGs. La exposición repetida al mismo contexto en el mismo día inhibe la expresión de *arc* mientras que la respuesta electrofisiológica sigue presentándose (Guzowski et al., 2006). En aves se ha observado que la exposición repetida a un canto de ave inhibe la expresión de *zif268* (Mello, Nottebohm, & Clayton, 1995); sin embargo esta repetición del canto sigue induciendo actividad de espiga (Stripling, Volman, & Clayton, 1997). La inhibición de la expresión de IEGs causada por la repetición de un estímulo puede estar relacionada con la dificultad para que ese estímulo sea asociado con alguna consecuencia, un fenómeno conocido como inhibición latente; se ha encontrado que estímulos familiares son menos efectivos que los nuevos tanto para ser asociados en un condicionamiento de miedo como para inducir la actividad de *c-fos* (Radulovic, Kammermeier, & Spiess, 1998). Parece ser entonces que la familiaridad de una situación sigue provocando la actividad eléctrica neuronal mientras que a nivel genómico ya no existe una modulación que permitiría cambios a largo plazo en la neurona como la cantidad y localización de receptores y de espinas dendríticas. Los trabajos anteriores permiten sugerir que cambios en la expresión génica de IEGs se acompañan de cambios en la actividad eléctrica cerebral mientras que lo contrario no siempre ocurre.

A continuación se describirán las características de algunos de los IEGs más estudiados: *zif268*, *c-fos*, *arc* y *homer1a*. Tanto *zif268* como *c-fos* son factores de transcripción pero la inducción de *zif268* parece ser más sensible a la actividad neuronal y ocurre de forma más gradual mientras que el umbral de inducción de *c-fos* es más alto pero la respuesta es más puntual. Por otra parte el gen efector *arc* es uno de los que se ha caracterizado mejor y de los que se han elegido por varios grupos de investigación para identificar células activadas por procesos cognoscitivos. Otro gen efector *homer1a* tiene

una estructura genómica más compleja que *arc* sin embargo su participación en la modificación estructural de la sinapsis lo convierte en un gen de gran relevancia para el estudio de la memoria.

*C-fos* es un gen de 9.54 kb compuesto por 4 exones cuyo ARNm tiene una longitud de 918 pb, este gen codifica para una proteína de 380 aa ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). La expresión de *c-fos* se induce por activación del AMPc y calcio; la región promotora de este gen contiene el elemento de respuesta a  $Ca^{2+}$ /AMPc (CRE) al que se une el factor de transcripción CREB, río arriba del sitio CRE se localiza el sitio de unión SRE (elemento resposivo a suero) al que se une el factor de transcripción SRF (factor responsivo a suero) (Sheng & Greenberg, 1990). *c-Fos* forma heterodímeros con los factores de transcripción *c-Jun* y *JunB*, teniendo un efecto estimulador en el primer caso y principalmente inhibitorio en el segundo (Sheng & Greenberg, 1990). Se sugiere que *c-Fos* regula la expresión de los genes *penk* (proencefalina) (Sonnenberg, Rauscher, Morgan, & Curran, 1989) y prodinorfina (Hughes & Dragunow, 1995) sin embargo los estudios no han sido concluyentes. Se ha encontrado que la expresión de *c-fos* es resultado de la actividad glutamatérgica, dopaminérgica y colinérgica (Greenberg, Ziff, & Greene, 1986; Liste, Rozas, Guerra, & Labandeira-Garcia, 1995; Waltereit et al., 2001) a través de la actividad de la adenilato ciclasa y de la vía de señalización de las MAPKs (Hodge et al., 1998; Sgambato, Pagès, Rogard, Besson, & Caboche, 1998). Sin embargo el umbral de inducción de *c-fos* parece ser más alto comparado con el de otros genes como *arc* y *zif268*. La estimulación con trenes de baja o alta frecuencia en animales en libre movimiento induce una robusta expresión de *arc* mientras que en la expresión de *c-fos* se observan cambios muy pequeños (Waltereit et al., 2001). La inducción de LTP empleando un tren de 10 estimulaciones produce un considerable incremento en la expresión de *zif268*, la expresión de *c-fos* es visible solo cuando el tren de estimulación se aumenta a 50 estimulaciones (Worley et al., 1993). Con respecto a la dinámica temporal de activación, mediante protocolos de estimulación visual se ha encontrado que ocurre un incremento rápido en el ARNm de *c-fos* en la corteza visual que alcanza su pico máximo a los 30 min y regresa a niveles basales a los 90 min mientras que su proteína tiene un incremento más lento y gradual que alcanza su pico máximo a los 120 min (Zangenehpour & Chaudhuri, 2002). Por otra parte, parecer ser que la evocación de tareas de memoria produce una síntesis más rápida de la proteína *c-Fos* que lo observado por una

estimulación visual ya que usualmente se observan cambios evidentes a los 90 min después de someter a los animales a recordar una tarea (Fukushima et al., 2014; Strekalova et al., 2003), incluso a los 30 min ya se observa un incremento considerable (Besnard et al., 2013). En la *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se muestran algunas propiedades de los genes *c-fos*, *zif268*, *arc* y *homer1a*.

**Tabla IV Características genómicas de *c-fos*, *zif268*, *arc* y *homer1a***

Gen	Tamaño del gen (kb) *	Número de exones *	Tamaño del ARNm (bases) *	Tamaño de la proteína (aa) *	Sitios de regulación en su región promotora	Neurotransmisores o neuromoduladores que inducen su expresión
<i>c-fos</i>	9.54	4	918	380	CRE y SRE [Sheng y Greenberg (1990)]	Glutamato, dopamina y acetilcolina [Greenberg et al. (1986); Liste et al. (1995); Waltereit et al. (2001)]
<i>zif268</i> ( <i>zenk</i> , <i>egr-1</i> , <i>ngf-1</i> o <i>krox-24</i> )	5.16	2	4,484	533	SRE, CRE y SP1 [Changelian et al. (1989)]	Glutamato, dopamina, acetilcolina y adrenalina [Cole et al. (1989); Cole et al. (1992); Hughes y Dragunow (1994); Tremere (2011)]
<i>arc</i>	3.49	3	3,055	396	SARE, SP1, AP1, CRE, MEF2 y SRF [Kawashima et al. (2009); Waltereit et al. (2001)]	Glutamato, acetilcolina y bdnf [(Kawashima et al. (2009); Link et al. (1995); Lyford et al. (1995); Teber et al. (2004); Wang et al. (2009); Ying et al. (2002)]
<i>homer1a</i>	96.1	9	3,287	186	SP1, AP1, CRE y MEF2 [Bottai et al. (2002)]	Glutamato y bdnf [Sato et al. (2001)]

\* Datos obtenidos de la base de datos [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

*Zif268*, también conocido como *zenk*, *egr-1*, *ngf-1* y *krox-24* es un factor de transcripción inducible cuya longitud es de 5.16 kb, posee 2 exones y su ARNm tiene una longitud de 4,484 pb que codifica para una proteína de 533 aa ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). *Zif268* es una proteína constituida por 3 dedos de zinc que le permiten reconocer sitios específicos en el ADN (Bozon, Davis, & Laroche, 2002). La expresión de *Zif268* se observa en la LTP *in vitro* e *in vivo* y en distintas etapas de la formación de la memoria (Bozon et al., 2002; Jones et al., 2001). Los sistemas dopaminérgico (Cole, Bhat, Patt, Worley, & Baraban, 1992), glutamatérgico (Cole et al., 1989), colinérgico (Hughes & Dragunow, 1994) y adrenérgico (Tremere, 2011) promueven la expresión de *zif268*. Esta inducción está mediada por la actividad de MEK y ERK (Davis, Vanhoutte, Pages, Caboche, & Laroche, 2000; Hodge et al., 1998; Sgambato et al., 1998). En su región

promotora, el gen *zif268* posee una caja TATA, un sitio de pegado SRE, un sitio CRE y un sitio SP1 (Changelian, Feng, King, & Milbrandt, 1989). La expresión de *zif268* es muy sensible a la actividad sináptica inducida por LTP incluso mayor que la observada para *c-fos* o *c-jun* (Wisden et al., 1990; Worley et al., 1993). Zangenehpour y Chaudhuri (2002) mostraron que la estimulación visual produce un incremento en el ARNm y la proteína de Zif268 en la corteza visual de la rata; el ARNm de *zif268* se acumula gradualmente llegando a su nivel máximo a los 60 min pero desde los 30 min ya se observa el 80% de su incremento y se mantiene elevado hasta por lo menos 120 min, la proteína tiene una dinámica similar, su máximo se logra a los 90 min y se mantiene elevada hasta por lo menos 120 min después de la estimulación. La dinámica de la proteína de Zif268 observada por Zangenehpour y Chaudhuri (2002) es muy parecida a la observada cuando los animales son sometidos a evocar la memoria generada en un condicionamiento de miedo al contexto, en estas condiciones se observa un incremento significativo de Zif268 a los 15 min que se mantiene hasta los 60 min (Besnard et al., 2013).

Ya como proteína, Zif268 se pega a sitios EGR y regula la expresión de diversos genes entre los que se encuentran *synapsina I* (Thiel, Schoch, & Petersohn, 1994), *psmb9*, *sgk*, *tap1* (James, Conway, & Morris, 2006), *nefl* (proteína de neurofilamentos de cadena ligera) (Pospelov, Pospelova, & Julien, 1994), *pc2* (prohormona convertasa 2) (Jansen, Ayoubi, Meulemans, & Van De Ven, 1997), *tgf-beta1* (factor de crecimiento transformante beta 1) Kim et al., 1994), *lhβ* (subunidad β de la hormona luteinizante) (Halvorson, Ito, Jameson, & Chin, 1998), *5-lo* (5-lipoxigenasa) (Silverman et al., 1998), *chat* (colinacetiltransferasa) (Quirin-Stricker, Mauvais, & Schmitt, 1997), *pnmt* (phenylethanolamine N-methyltransferase) (Ebert et al., 1994), *cd44* (Fitzgerald & O'Neill, 1999), *fibronectina* (Liu et al., 1999) y *sod1* (superóxido dismutasa de cobre-zinc) (Minc et al., 1999).

*Arc* es uno de los genes mayormente estudiados en procesos de plasticidad sináptica; la longitud de este gen es de 3.49 kb cuyo ARNm es de 3,055 pb, posee 3 exones y codifica para una proteína de 396 aa (www.ensembl.org). La expresión de *arc* se induce por la exploración de ambientes novedosos (Guzowski et al., 1999; Ramirez-Amaya, 2005; Vazdarjanova et al., 2006) pero también en diversas etapas de la memoria (Besnard et al., 2013; Guzowski, Setlow, Wagner, & McGaugh, 2001; Maddox & Schafe,

2011; Mamiya et al., 2009). La participación de *arc* se ha corroborado mediante el uso de oligos antisentido en el hipocampo y se ha encontrado que *arc* es necesario para el mantenimiento de la LTP y para la consolidación de una memoria espacial de una tarea que se realizó en el laberinto acuático en su versión oculta, de la tarea de evitación inhibitoria y de un aprendizaje de procedimiento en el laberinto en T (Daberkow, Riedy, Kesner, & Keefe, 2007; Guzowski et al., 2000; McIntyre et al., 2005). La síntesis basal de la proteína de Arc es muy baja, alcanza su pico máximo de activación alrededor de 1h en la región CA1 del hipocampo y en el giro dentado del hipocampo después de la expresión de una conducta (Besnard et al., 2013; Miyashita et al., 2008). La vida media del ARNm de *arc* es de 47 min (Rao et al., 2006), lo que limita la cantidad de proteína que puede ser sintetizada a partir de un transcrito.

La expresión de *arc* es inducida por BDNF, por la actividad de los receptores glutamatérgicos mGluR1, NMDAR, AMPAR y muscarínicos de ACh (Kawashima et al., 2009; Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Teber, Köhling, Speckmann, Barnekow, & Kremerskothen, 2004; Y. Wang, Zheng, Zhou, Sun, & Wang, 2009; Ying et al., 2002). La entrada de calcio producida por los NMDAR así como la producción de AMPc modulan la expresión de *arc* (Waltereit et al., 2001). Los segundos mensajeros calcio y AMPc influyen en la actividad de PKA, MAPK y CAMK que a su vez regulan la expresión de *arc* (Kawashima et al., 2009; Waltereit et al., 2001). En la región promotora de *arc* se han encontrado sitios SARE (elemento responsivo a actividad sináptica), sitios SP1 (proteína de especificidad 1), sitios AP1 (proteína activadora 1) y sitios de pegado para los factores de transcripción CREB, MEF2 (factor potenciador específico de miocito 2) y SRF (Kawashima et al., 2009; Waltereit et al., 2001).

Se ha observado que Arc se induce exclusivamente en neuronas principales que expresan CAMKII, esto se ha estudiado en el estriado, el hipocampo y la neocorteza (Vazdarjanova et al., 2006). Se ha demostrado que no sólo la señal de Arc colocaliza con células que expresan CAMKII sino que Arc interactúa directamente con esta cinasa y que esta interacción promueve el crecimiento de neuritas (Donai et al., 2003). Diversas evidencias demuestran que Arc interactúa con los AMPAR y que promueve su internalización. Cuando Arc se sobre expresa por transfección con un vector viral en rebanadas hipocampales se observa una reducción en las corrientes glutamatérgicas

producidas por los receptores AMPA, además ocurre una internalización de receptores AMPA que contienen subunidades GluR2 y GluR3 (Rial Verde, Lee-Osbourne, Worley, Malinow, & Cline, 2006). Se ha encontrado que después de la estimulación, Arc colocaliza con las subunidades GluR4 del receptor AMPA y que coprecipita con actina y con este mismo receptor (Mokin, Lindahl, & Keifer, 2006). Se propone que la endocitosis de los AMPAR es mediada por la interacción de Arc con la dinamina 2 y la endofilina 3 (Chowdhury et al., 2006). También se sugiere que Arc participa en la desestabilización del citoesqueleto a través de su interacción con MAP2 (proteína asociada a microtúbulos 2) (Fujimoto, Tanaka, Kumamaru, Okamura, & Miki, 2004). Ha sido difícil conciliar la regulación a la baja de los receptores AMPA membranales y la participación de Arc para el establecimiento de la LTP ya que esta última depende de la inserción de receptores AMPA en la membrana (Kessels & Malinow, 2009; Shepherd & Huganir, 2007). Una posible interpretación se basa en que el incremento en la eficiencia sináptica que acontece en la LTP ocurre a través de la inserción de receptores AMPA que contienen subunidades GluR1 mientras que la endocitosis mediada por Arc es específica para la subunidad GluR2; así, las sinapsis recién potenciadas son poco afectadas por la actividad de Arc ya que tienen un mayor contenido de subunidades GluR1 (Rial Verde et al., 2006).

La estimulación neuronal provoca que el ARNm y la proteína de Arc se localicen en los segmentos dendríticos que estuvieron activos (Steward, Wallace, Lyford, & Worley, 1998; Steward & Worley, 2001); esta es una propiedad muy importante de *arc* ya que permite identificar de manera muy fina las zonas neuronales de reciente activación. Algunos de los efectos de *arc* sobre la citoarquitectura neuronal son el aumento en la densidad de espinas y el aumento en la proporción de espinas delgadas los cuales se asocian con el aprendizaje (Peebles et al., 2010).

La producción de Arc también se ha empleado para evaluar la interacción entre dos regiones cerebrales. La administración del agonista  $\beta$ -adrenérgico clenbuterol en la amígdala mejora la consolidación de la memoria y a su vez induce la síntesis de Arc en el hipocampo, esta producción se observa 45 min después del entrenamiento en una tarea de evitación inhibitoria (McIntyre et al., 2005). De manera interesante, estos cambios en la proteína de Arc no se acompañan de cambios en los niveles de ARNm evaluados 30 min después del entrenamiento, esto sugiere que la modulación de la síntesis de la proteína de



Arc mediada por la amígdala sobre regiones eferentes ocurre a nivel posttranscripcional (Miyashita et al., 2008).

El gen *homer1* posee una estructura genómica más compleja que la de los genes previamente mencionados; tiene una longitud de 96.1 kb, posee 9 exones y la longitud de su ARNm es de 3,287 pb (www.ensembl.org). En su región promotora tiene sitios de pegado para los factores de transcripción SP1, AP1, CREB y MEF2 (Bottai et al., 2002). Por medio de splicing alternativo el gen *homer1* puede dar origen a dos proteínas de expresión constitutiva (*homer1b* y *homer1c*) y a dos proteínas de expresión temprana (*homer1a* y *ania3*) (Shiraishi-Yamaguchi & Furuichi, 2007). La isoforma *homer1a* es la que se ha estudiado asociada a eventos de plasticidad neuronal, además se sabe que este IEG compite funcionalmente con las isoformas constitutivas (Xiao, Cheng Tu, & Worley, 2000). Se ha encontrado que el glutamato y la neurotrofina BDNF inducen la expresión de *homer1a* (Sato, Suzuki, & Nakanishi, 2001). Después de una estimulación con choques electroconvulsivos se ha observado que la expresión de *homer1a* se incrementa a los 20 min (Bottai et al., 2002) mientras que la exploración de un ambiente novedoso induce su expresión 25-40 min después de la exposición (Vazdarjanova et al., 2002). *Homer1a* desestabiliza la densidad post-sináptica, disminuye la densidad y tamaño de las espinas dendríticas, reduce el número de conglomerados de receptores NMDA y el nivel de receptores AMPA membranales; lo anterior tiene un efecto negativo en el crecimiento de las sinapsis y reduce las corrientes mediadas por receptores NMDA y AMPA (Sala et al., 2003).

Diversos trabajos han demostrado que el sistema colinérgico y la actividad de ERK inducen la expresión de *zif268*, *c-fos* y *arc*. La administración de pilocarpina, un agonista de los receptores muscarínicos de acetilcolina, induce la expresión de *arc*, *zif268*, *c-fos* y *junB* (Hughes & Dragunow, 1994; Teber et al., 2004). La inducción de *c-fos*, *c-jun* y *zif268* mediada por los mAChR depende a su vez de la actividad de la PKC (Trejo & Brown, 1991; von der Kammer et al., 1998). Por otra parte Von der Kammer et al. (1998) han mostrado que la actividad del receptor M1 mediada por PKC es necesaria para inducir la expresión de *zif268*.

La inducción de IEGs depende de la actividad de ERK; esta enzima es de suma relevancia y su participación ha sido ampliamente descrita en distintas etapas de la

memoria (Peng et al., 2010). ERK pertenece a la familia de cinasas MAP, dentro de esta familia también se encuentran las subfamilias p38 y JNK (Roskoski, 2012). ERK activa a otras proteínas fosforilándolas en los residuos de serina o treonina. ERK está formada por dos proteínas denominadas ERK1 y ERK2 que a nivel de secuencia comparten un 84% de parentesco entre ellas, por lo anterior ERK es comúnmente referido como ERK1/2. En roedores ERK1 es una proteína de 380 aa y ERK2 posee 358 aa (Roskoski, 2012). ERK se activa a través de su fosforilación en residuos de serina y treonina mediados por la enzima MEK, una vez ocurrido esto, ERK entra al núcleo y activa a los factores de transcripción Elk1, c-Myk y CREB (Davis & Laroche, 2006).

Trabajos en los que se ha analizado por separado la actividad de ERK1 y ERK2 sugieren que podría existir una participación diferencial de estas proteínas en la memoria sin embargo los resultados aún no son concluyentes. Se han observado incrementos en la fosforilación de ERK1 como resultado del entrenamiento en el condicionamiento de miedo al tono y al entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objetos (Atkins, Selcher, Petraitis, Trzaskos, & Sweatt, 1998; Kelly, Laroche, & Davis, 2003), mientras que otros trabajos reportan que su fosforilación no se induce en el condicionamiento de tono ni en el condicionamiento de miedo al contexto (Atkins et al., 1998; Schafe et al., 2000). La fosforilación de ERK2 se ha observado aumentada después del entrenamiento en los condicionamiento de miedo al tono y al contexto (Atkins et al., 1998; Schafe et al., 2000) mientras que su expresión no se ve modificada en la tarea de reconocimiento de objetos (Kelly et al., 2003). De manera interesante se ha demostrado que la fosforilación de ERK2 en el estriado dorsal es necesaria para las asociaciones acción-consecuencia y en los aprendizajes dirigidos por metas, teniendo una mayor participación la porción medial para las primeras y la porción lateral para las segundas (Shiflett, Brown, & Balleine, 2010). Existen un par de trabajos en los que se han generado animales transgénicos que carecen del gen *erk1*. Uno de estos trabajos demuestra que la eliminación de ERK1, a pesar de provocar hiperreactividad en los ratones, no tiene ningún efecto en la adquisición de la tarea de evitación inhibitoria ni en los condicionamientos de miedo al tono y al contexto (Selcher, Nekrasova, Paylor, Landreth, & Sweatt, 2001); experimentos de LTP tampoco mostraron cambios en los animales transgénicos. Mazzucchelli et al. (2002) reportaron que la eliminación de *erk1* provoca una sobreexpresión de *erk2* posiblemente como un mecanismo compensatorio por la falta de *erk1*; además la estimulación con glutamato

incrementa la expresión de *c-fos* y de *zif268*, esto destaca la importancia del gen *erk1* para regular la actividad de *erk2* y de IEGs. En este mismo trabajo observaron una facilitación en las tareas de evitación activa y de evitación inhibitoria en los ratones transgénicos (Mazzucchelli et al., 2002). Cabe mencionar que si bien la fosforilación de ERK1 y ERK2 puede variar dependiendo de la tarea empleada, los niveles de la proteína se mantienen siempre estables, esto ha permitido sugerir que la principal regulación que sufre ERK1/2 es a nivel de fosforilación y no de expresión génica o síntesis de su proteína. Los trabajos anteriores demuestran que aún hace falta realizar más estudios para evaluar si existe un papel diferencial entre *erk1* y *erk2* en la memoria; posiblemente las diferencias radiquen en las estructuras cerebrales implicadas en cada tarea.

La actividad de ERK depende de los receptores muscarínicos de ACh; el bloqueo del M1 en CA1 del hipocampo pero no de otro tipo de receptor colinérgico (M2, M3 y M4), inhibe la activación de ERK (Berkeley, 2001). Hamilton y Nathanson (2001) demostraron que el receptor M1 es necesario para inducir la actividad de PKC y ERK. En conjunto podemos observar que la vía de señalización de M1 acoplada a ERK está implicada en la expresión de IEGs.

Cabe recalcar que la evocación también induce la síntesis de proteínas correspondiente a genes tardíos como lo son los receptores M1 (Ortega et al., 1996). El gen *chrm1* tiene una longitud de 17.56 kb, posee un sólo exón y su ARNm es de 4,159 pb que da origen a una proteína de 460 aa (www.ensembl.org). Lesiones de las vías colinérgicas producen un incremento en el receptor M1 que se acompaña de un incremento en su ARNm (Rossner, Schliebs, Perez-Polo, Wiley, & Bigl, 1995). Por otra parte, estudios *in vitro* han mostrado que el tratamiento con un agonista del receptor M1 reduce tanto los niveles de proteína de M1 como de su correspondiente ARNm (Wang et al., 1990). Los trabajos anteriores sugieren que la estimulación colinérgica regula negativamente la expresión del gen *chrm1* y esto se acompaña a su vez de una disminución en la abundancia de este receptor.

## 6.2 Justificación

La expresión génica y la síntesis de proteínas se inducen por la evocación y permiten modificar una conducta aprendida. Se conoce la identidad de algunos genes y proteínas inducidos después de la evocación de una memoria; la mayoría de estos genes corresponden a genes de expresión temprana y se han estudiado principalmente en el hipocampo y la amígdala. Sin embargo, no sólo los genes de expresión temprana se inducen por la evocación, se sabe que el receptor muscarínico M1 aumenta después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria. Este incremento se ha observado en el hipocampo y en el estriado. Por otra parte, el receptor M1, a través de la vía de señalización de ERK1/2, regula la expresión de genes como *zif268* y *arc*. Por lo anterior, el estudio de la expresión génica del receptor M1 y de sus blancos río abajo podría ayudar a entender los mecanismos moleculares que se inducen después de la evocación. Un estudio que evalúe los genes ya mencionados en el estriado, amígdala e hipocampo después de la evocación podría dar una visión amplia de los mecanismos de plasticidad neuronal implicados en la modificación de una conducta aprendida debido a la evocación de la memoria.

Por otra parte, la expresión génica después de la evocación ha sido estudiada en el condicionamiento de miedo al contexto y al tono y en el laberinto acuático en su versión espacial; sin embargo, en otras tareas como la evitación inhibitoria se sabe poco de la inducción de la expresión génica después de la evocación.

## 6.3 Hipótesis

Después de la evocación de la tarea de evitación inhibitoria:

- Aumentará la expresión de *chrm1* en el estriado anterodorsal y no habrá cambios en la amígdala.
- No habrá cambios en la expresión de *erk1* en el hipocampo dorsal, en la amígdala ni en el estriado anterodorsal.
- Aumentará la expresión de *arc* en la amígdala, el hipocampo y el estriado.
- Incrementará la expresión de *zif268* en la amígdala, el hipocampo y el estriado.

## 6.4 Objetivo general

Analizar la expresión de los genes *chrm1*, *erk1*, *arc* y *zif268* en el estriado anterodorsal, amígdala e hipocampo dorsal después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria.

## 6.5 Objetivos específicos

- Analizar la expresión de los genes *chrm1*, *erk1*, *arc* y *zif268* en el estriado anterodorsal y amígdala 90 min después de la evocación de la tarea de evitación inhibitoria.
- Analizar la expresión de los genes *chrm1*, *erk1*, *arc* y *zif268* en el estriado anterodorsal, amígdala e hipocampo dorsal 30, 90 y 180 min después de la evocación de la tarea de evitación inhibitoria.

## 6.6 Método

### 6.6.1 Grupos experimentales

#### 6.6.1.1 Experimento 1A

Para el análisis de la expresión génica a los 90 min después de la evocación los animales fueron asignados de manera aleatoria a alguno de los siguientes 4 grupos (Figura 7): 1) *Evocación* formado por animales entrenados en la tarea de evitación inhibitoria empleando un choque de 1.0 mA, evaluados en una prueba de evocación realizada 48 h después y sacrificados 90 min después del inicio de esta prueba, 2) *NoChoque* constituido por animales entrenados sin recibir choque eléctrico, evaluados en una prueba de evocación 48 h después y sacrificados 90 min después del inicio de esta prueba, 3) *NoEvocación* compuesto por animales entrenados empleando un choque de 1.0 mA y sacrificados 49.5 h después y 4) *Intacto* formado por animales que permanecieron en su caja habitación y fueron sacrificados 3 días después de la última sesión de manipulación en un horario del día similar al del resto de los grupos.

#### 6.6.1.2 Experimento 1B

En el segundo conjunto de experimentos se estudiaron 10 grupos (Figura 7): 1) *Evocación-30* formado por animales entrenados en la tarea de evitación inhibitoria empleando un choque de 1.0 mA, fueron evaluados en una prueba de evocación realizada 48 h después y sacrificados 30 min después del inicio de esta prueba, 2) *Exploración-30*

formado por animales entrenados sin recibir choque eléctrico, colocados 48 h después en el compartimento iluminado con la puerta en forma de guillotina siempre cerrada durante un tiempo similar al que permanecieron los animales del grupo Evocación dentro del compartimento iluminado y sacrificados 30 min después del inicio de esta exposición, 3) *NoChoque-30* se constituyó por animales que fueron entrenados sin choque eléctrico, evaluados en una prueba de evocación (donde la rata tuvo libre acceso al compartimento oscuro) 48 h después y sacrificados 30 min después del inicio de la prueba, 4) *Evocación-90* estuvo integrado por animales que fueron sometidos al mismo protocolo que el grupo Evocación-30 con la diferencia de que fueron sacrificados 90 min después del inicio de la prueba de evocación, 5) *Exploración-90* formado por animales que fueron sometidos al mismo protocolo que el grupo Exploración-30 con la diferencia de que fueron sacrificados 90 min después del inicio de la exposición, 6) *NoChoque-90* se constituyó por animales que fueron sometidos al mismo protocolo que el grupo NoChoque-30 con la diferencia de que fueron sacrificados 90 min después del inicio de la prueba de evocación, 7) *Evocación-180* estuvo formado por animales que fueron sometidos al mismo protocolo que el grupo Evocación-30 con la diferencia de que fueron sacrificados 180 min después del inicio de la prueba de evocación, 8) *Exploración-180* estuvo integrado por animales que fueron sometidos al mismo protocolo que el grupo Exploración-30 con la diferencia de que fueron sacrificados 180 min después del inicio de la exposición, 9) *NoChoque-180* se formó por animales que fueron sometidos al mismo protocolo que el grupo NoChoque-30 con la diferencia de que fueron sacrificados 180 min después del inicio de la prueba de evocación y 10) *Intacto* que se conformó con animales que permanecieron en su caja habitación y fueron sacrificados 3 días después de la última sesión de manipulación en un horario del día similar al del resto de los grupos.

#### 6.6.2 Tarea de evitación inhibitoria

Empleamos la versión “step-through” de un solo ensayo. Durante el entrenamiento la rata se colocó en el compartimento iluminado, transcurridos 10 s la puerta que divide los compartimentos se abrió y se registró la latencia para cruzar al compartimento oscuro (latencia de entrada). Cuando la rata cruzó a este compartimento la puerta se cerró y se administró un choque eléctrico de 1.0 mA. Cinco segundos después la puerta se reabrió permitiendo al animal regresar al compartimento iluminado y el estimulador fue apagado;

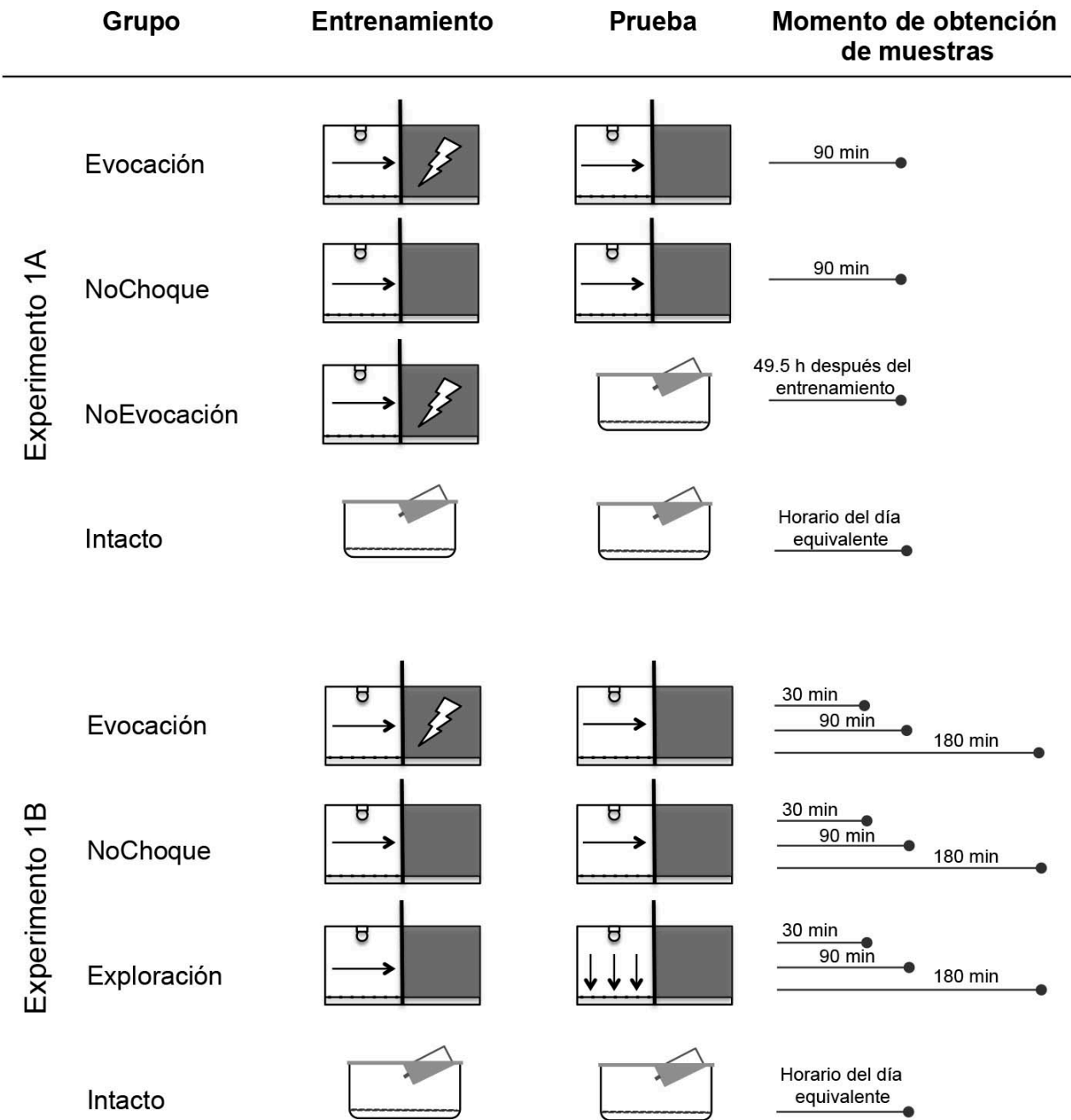
el tiempo para regresar al compartimento iluminado se registró como latencia de escape. Después de transcurridos 30 s en el compartimento iluminado, el animal fue regresado a su caja habitación.

La prueba de evocación se realizó 48 h después del entrenamiento omitiéndose el choque eléctrico. La rata fue colocada en el compartimento iluminado, transcurridos 10 s se abrió la puerta en forma de guillotina y se registró el tiempo para entrar al compartimento oscuro (latencia de retención). La sesión se dio por terminada una vez que la rata entró al compartimento oscuro o después de que transcurrieran 600 s sin que entrara a éste.

### 6.6.3 Obtención de tejidos, extracción de ARN y síntesis de ADNc

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente después se disecaron las estructuras cerebrales. Para el Experimento1A se disecaron sólo el estriado anterodorsal y la amígdala mientras que para el Experimento1B se obtuvo adicionalmente el hipocampo dorsal. Las muestras fueron almacenadas individualmente en RNAlater (Qiagen), congeladas en hielo seco y refrigeradas a -70 °C para su posterior procesamiento.

El ARN del Experimento1A se obtuvo empleando el kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Debido a la limitada cantidad de ARN obtenido con el kit anterior se decidió cambiar a la técnica de Trizol® para el Experimento1B. En la técnica de Trizol se empleó 1 ml de Trizol® por cada 100 mg de tejido, se adicionó cloroformo (200 µl por cada 1 ml de Trizol® agregado), se incubó por tres minutos y se centrifugó a 12,000 g por 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregó isopropanol absoluto (1/2 volumen del volumen total de Trizol®), las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 10 min y se decantó el sobrenadante. Se realizó un primer lavado con ETOH frío al 75% empleando el mismo volumen que de Trizol®, se centrifugó a 12,000 g, se decantó y se realizó un segundo lavado con 1/2 volumen de ETOH frío al 75% con una centrifugación final a 5,000 g por 5 min, se decantó y los tubos se secaron sobre papel absorbente. El RNA total se resuspendió en H<sub>2</sub>O PiSA.



**Figura 7.** Esquema de los grupos empleados para el análisis de la expresión génica después de la evocación. Durante el día de la prueba los grupos Evocación y NoChoque tuvieron libre acceso al compartimento oscuro mientras que el grupo Exploración permaneció en el compartimento iluminado por un lapso de tiempo equivalente al grupo Evocación. El día de la prueba el grupo NoEvocación permaneció en su caja habitación hasta el momento del sacrificio. El momento de obtención de muestras está indicado con respecto al inicio de la sesión de prueba, de lo contrario se especifica el tiempo.



El ARN obtenido con ambas técnicas fue cuantificado en un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y se verificó la integridad del mismo mediante un gel de agarosa al 1% en TBE 1X donde las bandas del ARN ribosomal fueron claramente observadas.

Se procedió a incubar el ARN con DNAsal para eliminar posibles restos de DNA en la muestra. Para el Experimento1A se empleó 1 µg de ARN mientras que para el Experimento1B se emplearon 2 µg, se agregaron 8 µl del buffer MMLV (5X), 1 µg de DNAsal (Invitrogen) y se llevó a un volumen final de 33 µl empleando H<sub>2</sub>O PiSA. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min y posteriormente se colocaron a 70°C durante 5 min.

Para la síntesis del ADNc (ADN complementario), a las preparaciones anteriores se adicionaron 10µM de oligo dT, 10mM de dNTPs, 2,500 U de RNAsin, 200 U de M-MLV y 3 µl de H<sub>2</sub>O para tener un volumen final de 40 µl. Las muestras fueron posteriormente tratadas en un termociclador a 42°C durante 50 min y posteriormente a 70°C durante 15 min.

#### 6.6.4 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos *chrm1*, *erk1*, *arc* y *zif28* fueron diseñados con el programa Oligo 7 usando las secuencias de los exones obtenidas de la base de datos Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Los oligonucleótidos se diseñaron para exones distintos excepto para el caso de *chrm1* que sólo cuenta con un exón. Las secuencias de los genes *actina*, *cycA*, *ywhaz* y *sod2* fueron obtenidas de los trabajos de Bonefeld, Elfving, y Wegener (2008) y Rodríguez, Limón-Pacheco, Carrizales, Mendoza-Trejo, y Giordano (2010). Las secuencias de oligonucleótidos para cada gen estudiado se muestran en la Tabla V.

#### 6.6.5 Preparación de reacciones de PCR

Las reacciones se llevaron a cabo en capilares de vidrio empleando 1 µl de LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR green I Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 5 µM de cada oligonucleótido, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 µl de cDNA (de la dilución correspondiente) y H<sub>2</sub>O PiSA en un volumen final de 10 µL. Cada muestra se analizó por duplicado.

## 6.6.6 Condiciones del termociclador

Los condiciones de corrida fueron: desnaturalización (95°C, 3 min) y 50 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95 °C durante 10 seg; alineamiento 60 °C para *sod2*, *cycA*, *ywhaz*, *actina*, *arc* y *zif268* y 59 °C para *erk1* y *chrm1* durante 45 seg; extensión 72 °C, 60 seg). La especificidad de la reacción se verificó mediante curvas “melting” y secuenciando el amplicón.

**Tabla V. Oligonucleótidos empleados y sus características bioquímicas**

Gen	Identificador	Nombre de la proteína	Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Exón	% GC	Tm °C	Longitud (pb)	Tamaño del amplicón (pb)
<i>actina</i>	NM_031144.3	b-actin	act-F	TGTCACCAACTGGGACGATA	3	50.0	55.7	20	165
			act-R	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	4	50.0	55.0	20	
<i>arc</i>	NM_019361.1	Arc, Arg3.1	arc2-F	AGTCTTCAGAGCCAGGAGAACGA	2	52.2	59.5	23	235
			arc2-R	CGCTGGCTTGTCTTACCTTC	3	57.1	58.6	21	
<i>chrm1</i>	NM_080773.1	Receptor muscarínico colinérgico M1	M1-S	GGCAATACCTAGTTGGGAGCGGA	1	58.3	60.1	24	247
			M1-As	GGCTGTGACCTCTCTGAGCT	1	60.0	61.1	20	
<i>cycA</i>	NM_017101.1	Ciclofilina A, PPIA	cycA-F	AGCACTGGGGAGAAAGGATT	3	50.0	56.2	20	248
			cycA-R	AGCCACTCAGTCTTGGCAGT	5	55.0	58.9	20	
<i>erk1</i>	NM_017347.2	Mapk3, Erk1, P44	p44-S	GCTCTCCAACCGGCCTATCTT	5	57.1	62.1	21	269
			p44-As	GGTGAGCCAGTGCTTCTCTACT	7	56.5	59.3	23	
<i>sod2</i>	NM_017051	Superóxido dismutasa [Mn] mitocondrial	sod2-F	TGGACAAACCTGAGCCCTAA	3	50.0	56.0	20	77
			sod2-R	GACCCAAAGTCACGCTTGATA	4	47.6	55.0	21	
<i>ywhaz</i>	NM_011740.3	Tirosin 3-monooxigenasa/triptofano zeta	ywhaz-For	TTGAGCAGAAGACGGAAGGT	2	50.0	56.2	20	136
			ywhaz-Rev	GAAGCATTGGGGATCAAGAA	3	45.0	52.8	20	
<i>zif268</i>	NM_012551.2	Zif268, Egr1, Ngf1, Krox-24, Zenk	zif268-For	CAGCAGCGCTTTCAATCCTCA	1	52.4	58.2	21	249
			zif268-Rev	GTCATGCTCACAAAGGCCACT	2	55.0	57.9	20	

## 6.6.7 Curvas de eficiencia

Se realizaron curvas estándar empleando el ADNc de muestras representativas de todos los grupos experimentales con el propósito de determinar la eficiencia de amplificación y para elegir la dilución adecuada para estudiar la expresión génica en sujetos individuales. Para el Experimento1A se estudiaron las diluciones 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 y 1:1000 y para el Experimento1B se emplearon las diluciones 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80. Las diluciones fueron preparadas empleando agua PiSA. Con base en los resultados obtenidos con las curvas anteriores se decidió usar la dilución 1:100 en el Experimento1A y la dilución 1:10 para el Experimento1B.

### 6.6.8 Elección de genes de referencia

Una vez seleccionada la dilución óptima del ADNc, se evaluaron diversos genes de referencia en todos los grupos experimentales para elegir el gen más estable. Para el Experimento1A se evaluaron los genes *cycA*, *sod2*, *ywhaz* y *actina*. Los genes de referencia que se evaluaron en el Experimento1B fueron *cycA*, *ywhaz* y *sod2*. Para la elección del gen de referencia se evaluaron los genes anteriormente mencionados por duplicado en 3 sujetos elegidos al azar provenientes de cada uno de los grupos. La elección del gen de referencia se efectuó empleando el software Normfinder (Andersen, 2004). De manera general, el programa calcula la varianza intra grupo y la varianza inter grupos, empleando esas dos varianzas y un estimador Bayesiano se obtiene el valor de estabilidad para un gen; entre menor sea el valor de estabilidad menor es la variabilidad de ese gen en nuestro diseño experimental. El programa también calcula el valor de estabilidad para todas las combinaciones de dos genes, primero obtiene el promedio de expresión de los dos genes y después calcula el valor de estabilidad de esa combinación como se describió para un gen. Finalmente el programa nos indica cual es el gen más estable para los grupos que se desean comparar y cual es la mejor combinación de 2 genes.

Para descartar que la amplificación observada fuera debida a una contaminación con ADN genómico, se realizó un control para cada uno de los genes estudiados que consistió en sintetizar una muestra de ADNc sin emplear la retrotranscriptasa (MMLV). No se observó amplificación en ninguno de los genes estudiados confirmando así que la amplificación que observamos corresponde al ARNm de interés.

### 6.6.9 Análisis estadístico

Para el Experimento1A las latencias de entrada, de escape y de retención de la tarea de evitación inhibitoria se analizaron en forma independiente con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguida por la prueba *post-hoc* U de Mann Whitney. Se decidió emplear una prueba no paramétrica debido a que tenemos un tiempo de corte máximo de espera para que los animales crucen de un compartimento a otro (600 seg), este tiempo máximo provoca que la distribución de los datos no sea Gaussiana. En el Experimento1B para las latencias de entrada, de escape y de retención se analizó primero

el factor grupo y después el factor tiempo con pruebas independientes de Kruskal Wallis también seguidas por la prueba *post-hoc* U de Mann Whitney.

Los cambios en los niveles de expresión fueron analizados empleando el método  $2^{-\Delta'Ct}$  descrito por Livak y Schmittgen (2001) donde  $\Delta'Ct = Ct_{GenInterés} - Ct_{GenReferencia}$ .  $C_t$  se refiere a Crossing threshold y corresponde al número de ciclos requeridos para cruzar el umbral exponencial de la curva de amplificación en la reacción de PCR, el valor de  $C_t$  también es conocido como  $C_p$  (Crossing point). Los valores de todas las muestras fueron referenciados al grupo Intacto cuyo promedio fue designado como 1.0. Los datos se expresaron como número de veces de cambio con respecto a Intacto.

Para el Experimento 1A se compararon todos los grupos con un ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. En el Experimento 1B se compararon todos los grupos excepto el Intacto con un ANOVA de 2 vías con factores tiempo (30, 90 y 180 min) y grupo (Evocación, Exploración y NoChoque), la prueba *post-hoc* también fue Tukey. Para evaluar el cambio con respecto a Intacto se realizó un ANOVA de una vía que incluyó a todos los grupos y como prueba *post-hoc* Dunnett's para comparar cada uno de los grupos sólo con respecto al grupo Intacto.

## 6.7 Resultados

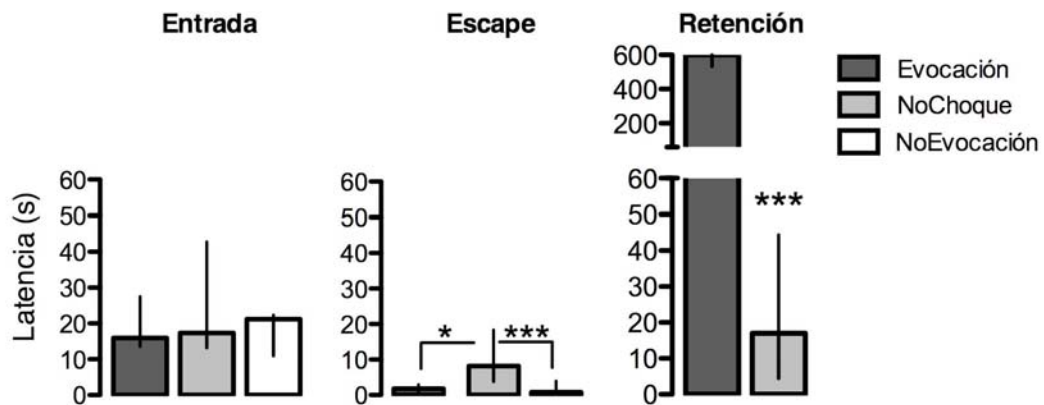
6.7.1 Experimento 1A. Estudio de la expresión génica 90 min después de la prueba de evocación

### 6.7.1.1 Latencias conductuales

Al analizar las latencias de entrada encontramos que no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $H(2) = 0.6766$ ,  $p = 0.7130$ ), demostrando así que los sujetos tenían las mismas capacidades motoras y perceptuales durante el entrenamiento (Figura 8). En las latencias de escape encontramos diferencias significativas ( $H(2) = 14.91$ ,  $p < 0.001$ ), las comparaciones *post-hoc* mostraron que los animales del grupo NoChoque tomaron más tiempo para escapar del compartimento oscuro que el resto de los grupos (NoChoque vs NoEvocación  $U = 6$ ,  $p < 0.01$ ; NoChoque vs Evocación  $U = 10$ ,  $p < 0.001$ ); entre los grupos NoEvocación y Evocación no se encontraron diferencias significativas ( $U = 31$ ,  $p = 0.3721$ ) (Figura 8). Lo anterior demuestra que efectivamente los animales que

recibieron choque durante el entrenamiento lo percibieron y por ello escaparon más rápido del compartimento oscuro que los animales que no recibieron choque.

Al comparar las latencias de retención encontramos que los animales del grupo Evocación tardaron más tiempo en entrar al compartimento oscuro que los animales del grupo NoChoque ( $U=0$ ,  $p<0.001$ ) (Figura 8); esto demuestra que el grupo Evocación asoció el contexto con la consecuencia aversiva.

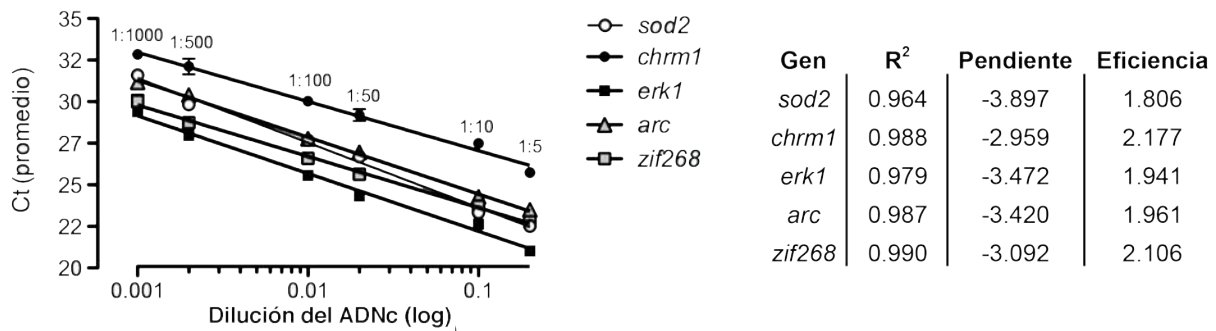


**Figura 8.** Latencias en la tarea de evitación inhibitoria para el análisis de la expresión génica a los 90 min (Experimento1A). Se muestran las medianas con rangos intercuartil de las latencias registradas el día del entrenamiento (Entrada y Escape) y el día de la prueba (Retención),  $n = 7-12$ . \*\*\* $p<0.001$ , \* $p<0.05$ .

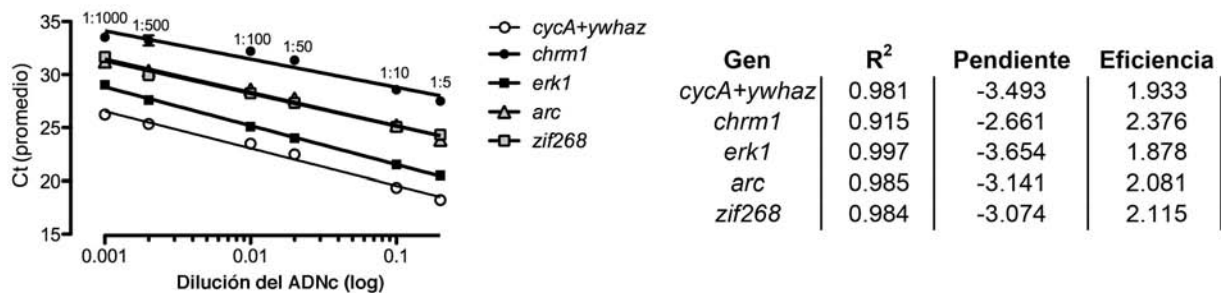
### 6.7.1.2 Curvas de eficiencia y elección del gen de referencia

El análisis de la eficiencia nos permite conocer el número de copias que se generan en cada ronda de la reacción de PCR. Una reacción 100% eficiente produce 2 copias en cada ciclo. Usando la fórmula  $E = (10^{-1/m})$ , donde  $m$  es la pendiente de la recta, podemos calcular la eficiencia de la reacción y así saber el número de copias que se generan en cada ciclo. Para conocer la pendiente de la recta se debe analizar la expresión génica usando distintas diluciones seriadas de una muestra representativa de ADNc correspondiente a sujetos de todas las condiciones experimentales. Además, al evaluar las diluciones seriadas se puede elegir la dilución adecuada para analizar la expresión génica en muestras individuales, comúnmente se elige un valor intermedio de las diluciones evaluadas. La eficiencia de *chrm1*, *erk1*, *arc* y *zif268* en el estriado varió entre 1.941 y 2.177 (Figura 9) mientras que la eficiencia de estos mismos genes en la amígdala

varió entre 1.878 y 2.376 (Figura 10); por lo tanto las eficiencias estuvieron cercanas al valor ideal 2.0. Decidimos entonces emplear la dilución 1:100 para estudiar de manera individual la expresión génica tanto en el estriado como en la amígdala.



**Figura 9.** Curvas de eficiencia de muestras de estriado obtenidas 90 min después de la evocación. La gráfica de la izquierda muestra los valores de Ct promedio  $\pm$  el error estándar de la media obtenidos en la dilución correspondiente de ADNc. Los valores de ajuste de la regresión lineal ( $R^2$ ), de la pendiente de la curva de regresión así como del cálculo de la eficiencia para cada gen se muestran en la tabla de la derecha.



**Figura 10.** Curvas de eficiencia de muestras de amígdala obtenidas 90 min después de la evocación. La gráfica de la izquierda muestra los valores de Ct promedio  $\pm$  el error estándar de la media obtenidos en la dilución de ADNc correspondiente. Los valores de ajuste de la regresión lineal ( $R^2$ ), de la pendiente de la curva de regresión así como del cálculo de la eficiencia para cada gen se muestran en la tabla de la derecha.

Una vez que supimos que las eficiencias de los genes de interés eran cercanas a 2.0 y que elegimos la dilución 1:100 procedimos a realizar el análisis del gen de referencia con menor variabilidad dentro de nuestros grupos experimentales. Para esto analizamos la expresión de *actina*, *cycA*, *sod2* y *ywhaz* en la dilución 1:100. Empleando el software Normfinder encontramos que el gen más estable para el estriado fue *sod2* y para la

amígdala fue la media geométrica de *cycA* y *ywhaz* (Tabla VI). Procedimos a evaluar la eficiencia de estos genes de referencia para saber si su dinámica de amplificación era similar a la de los genes de interés. Encontramos que la eficiencia de *sod2* en estriado fue de 1.806 (Figura 9) mientras que la eficiencia de *cycA+ywhaz* en la amígdala fue de 1.933 (Figura 10).

**Tabla VI. Análisis de Normfinder para la elección del gen de referencia en el Experimento 1A**

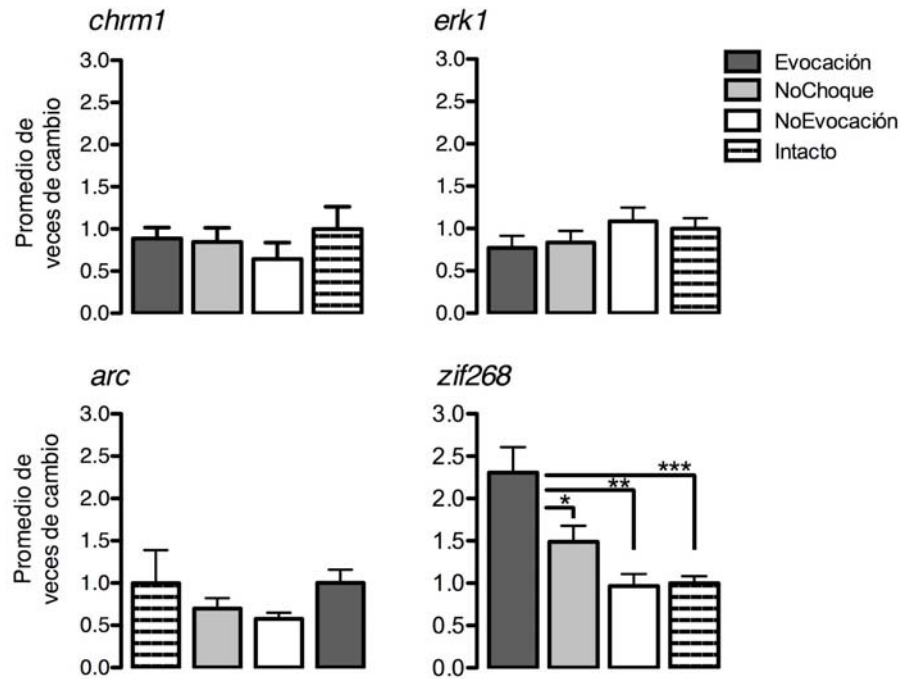
Estriado		Amígdala	
Gen	Valor de estabilidad	Gen	Valor de estabilidad
<i>actina</i>	0.004	<i>actina</i>	0.004
<i>cycA</i>	0.005	<i>cycA</i>	0.003
<i>sod2</i>	0.002	<i>sod2</i>	0.004
<i>ywhaz</i>	0.004	<i>ywhaz</i>	0.003
Mejor gen	Valor de estabilidad	Mejor gen	Valor de estabilidad
<i>sod2</i>	0.002	<i>cycA</i>	0.003
Mejor combinación de dos genes	Valor de estabilidad	Mejor combinación de dos genes	Valor de estabilidad
<i>sod2</i> y <i>ywhaz</i>	0.003	<i>cycA</i> y <i>ywhaz</i>	0.002

### 6.7.1.3 Expresión génica en el estriado y la amígdala

En el estriado encontramos que la expresión de *chrm1*, *erk1* y *arc* no difirió significativamente entre los grupos (*chrm1*:  $F_{(3,32)} = 0.4554$ ,  $p = 0.715$ ; *erk1*:  $F_{(3,32)} = 0.977$ ,  $p=0.416$ ; *arc*:  $F_{(3,32)} = 0.7010$ ,  $p = 0.558$ ). Por otra parte la expresión de *zif268* mostró diferencias significativas ( $F_{(3,32)} = 9.082$ ,  $p = 0.0002$ ); la expresión de *zif268* fue mayor en el grupo Evocación con respecto a los otros grupos ( $p < 0.001$  vs. Intacto;  $p < 0.01$  vs NoEvocación;  $p < 0.05$  vs NoChoque) y no se encontraron otras diferencias significativas (Figura 11).

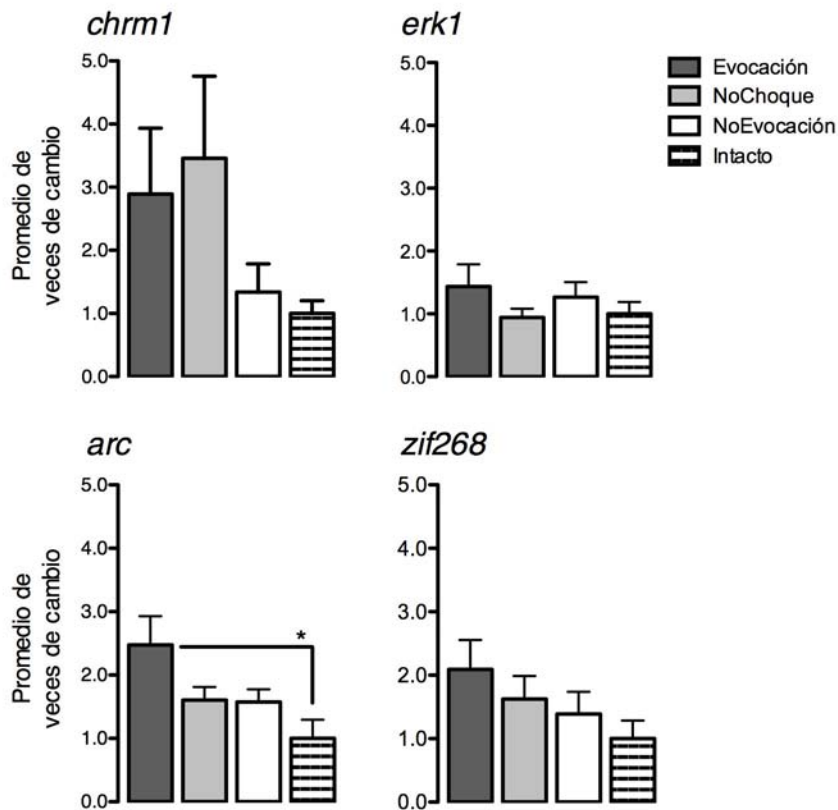
El análisis de la expresión génica en la amígdala mostró que no hubo diferencias significativas en *chrm1*, *erk1* ni en *zif268* (*chrm1*:  $F_{(3,30)} = 1.748$ ,  $p = 0.1783$ ; *erk1*:  $F_{(3,30)} = 0.827$ ,  $p=0.489$ ; *zif268*:  $F_{(3,30)} = 1.568$ ,  $p = 0.2176$ ). Sin embargo, la expresión de *arc* difirió

significativamente entre los grupos ( $F_{(3,30)} = 3.682$ ,  $p = 0.0289$ ); las comparaciones pareadas demostraron que solo el grupo Intacto fue diferente del grupo Evocación ( $p < 0.05$ ) (Figura 12).



**Figura 11.** Expresión génica en el estriado 90 min después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra el promedio de veces de cambio  $\pm$  el error estándar de la media. Los valores se expresan con referencia al grupo Intacto. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ;  $n = 6-10$ .





**Figura 12.** Expresión génica en la amígdala 90 min después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra el promedio de veces de cambio  $\pm$  el error estándar de la media. Los valores se expresan con referencia al grupo Intacto. \* $p < 0.05$ ;  $n = 7-10$ .

Debido a la dinámica temporal ya conocida de los genes de expresión temprana *arc* y *zif268* (Besnard et al., 2013; Guzowski et al., 2001), una gran interrogante fue si los resultados observados para *arc* en el estriado y *zif268* en amígdala pudieron deberse a que la expresión de estos genes ocurrió antes o después de los 90 min. Por lo anterior decidimos evaluar la expresión génica a los 30, 90 y 180 min después de la evocación (Experimento1B). Ya que no encontramos diferencias significativas en el Experimento1A en el grupo NoEvocación con respecto a Intacto y NoChoque decidimos no incluir este grupo en el Experimento1B. Otro factor importante que consideramos para el diseño del Experimento1B fue que la expresión observada en *zif268* en el estriado en el grupo Evocación podría haberse debido simplemente al mayor tiempo que permanecieron en el contexto estos animales con respecto a los de NoChoque (Latencia retención, NoChoque

mediana = 17 seg , Evocación mediana = 600 seg) (Figura 8) y no necesariamente a la evocación de la memoria. Por lo anterior nos pareció relevante incluir un grupo de animales entrenados sin choque pero que el día de la prueba permanecieran el mismo tiempo en el compartimento iluminado que los animales del grupo Evocación, a este nuevo grupo se le denominó Exploración. Cabe mencionar que el día de la prueba el grupo Exploración permaneció en el compartimento iluminado sin tener acceso al compartimento oscuro ya que la puerta que divide los compartimentos estuvo siempre cerrada (Figura 7). Nos pareció necesario seguir incluyendo al grupo NoChoque ya que estos animales representan un grupo que no realizó ninguna asociación entre el contexto y la consecuencia aversiva.

Como describimos en los antecedentes, el hipocampo presenta cambios en la expresión génica y en la síntesis de proteínas después de la evocación (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), por lo anterior decidimos incluir esta estructura en el análisis.

## 6.7.2 Experimento 1B. Análisis temporal de la expresión génica en el estriado, amígdala e hipocampo después de la evocación

### 6.7.2.1 Latencias conductuales

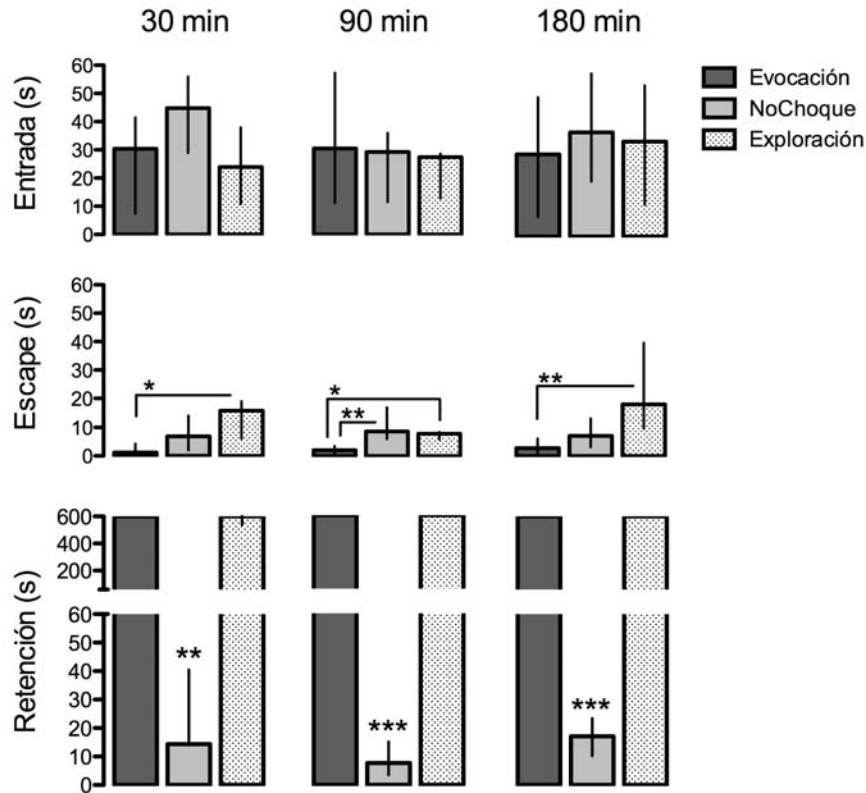
Debido a que todos los animales fueron tratados de la misma forma antes de la sesión de entrenamiento esperábamos que las latencias de entrada no difirieran entre los grupos. Al analizar las latencias de entrada encontramos que no hubo diferencias entre los grupos en ninguno de los tiempos estudiados (30 min:  $H(2)=3.899$ ,  $p= 0.1424$ ; 90 min:  $H(2)= 0.4358$ ,  $p= 0.8042$ ; 180 min:  $H(2)= 0.6473$ ,  $p= 0.7235$ ). Al comparar la conducta de cada grupo a través de los distintos tiempos tampoco encontramos diferencias (Evocación:  $H(2)= 0.6525$ ,  $p= 0.7216$ ; NoChoque:  $H(2)= 3.569$ ,  $p= 0.1605$ ; Exploración:  $H(2)= 0.197$ ,  $p= 0.9062$ ). Lo anterior demuestra que los animales presentaron las mismas habilidades para moverse de un compartimento al otro al inicio del entrenamiento y que independientemente del momento en el que los animales fueron sacrificados sus latencias de entrada fueron las mismas (Figura 13).

Recordemos que durante el entrenamiento sólo el grupo Evocación recibió el choque eléctrico de 1 mA, por ello es de esperarse que las latencias de escape sean

menores en el grupo Evocación con respecto a Exploración y NoChoque. En las latencias de escape encontramos diferencias significativas entre Evocación, Exploración y NoChoque en todos los tiempos estudiados (30 min:  $H(2) = 7.135$ ,  $p = 0.0282$ ; 90 min:  $H(2) = 13.0$ ,  $p < 0.01$ ; 180 min:  $H(2) = 9.653$ ,  $p < 0.01$ ) mientras que el mismo grupo comparado contra él mismo a los distintos tiempos no difirió (Evocación:  $H(2) = 0.4334$ ,  $p = 0.8052$ ; NoChoque:  $H(2) = 1.525$ ,  $p = 0.4664$ ; Exploración:  $H(2) = 2.988$ ,  $p = 0.2245$ ) (Figura 13). Al realizar la prueba *post-hoc* encontramos que a los 30 y a los 180 min las latencias de escape difirieron entre el grupo Evocación y el grupo Exploración (30 min: Evocación vs Exploración  $U = 9$ ,  $p < 0.05$ ; 180 min: Evocación vs Exploración  $U = 3.5$ ,  $p < 0.01$ ). A los 90 min observamos que la latencia de escape en el grupo Evocación fue menor con respecto a los grupos NoChoque y Exploración (Evocación vs NoChoque  $U = 8$ ,  $p < 0.01$ ; Evocación vs Exploración  $U = 11.50$ ,  $p < 0.05$ ). Estos resultados muestran que si bien los animales del grupo Evocación tuvieron latencias bajas para escapar una vez percibido el choque, no siempre difirieron del grupo NoChoque, del cual era de esperarse que difiriera ya que tanto NoChoque como Exploración no fueron expuestos al choque eléctrico. Lo anterior podría sugerir que los animales de NoChoque salieron muy rápido del compartimento oscuro, tal vez como reflejo de ansiedad.

El análisis de las latencias de retención ayudó a clarificar los resultados obtenidos en las latencias de escape. Al haber sido expuestos tanto al contexto como al choque eléctrico era de esperarse que los animales del grupo Evocación mostraran latencias altas para entrar al compartimento oscuro el día de la prueba mientras que los animales del grupo NoChoque deberían mostrar latencias muy parecidas a las del día del entrenamiento; hay que recordar que los animales del grupo Exploración fueron forzados a permanecer en el compartimento iluminado el mismo tiempo que los animales del grupo Evocación tomaron en entrar al compartimento oscuro, por ello las latencias de retención entre Evocación y el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado registrado para Exploración no deberían diferir. Encontramos diferencias significativas en las latencias de retención en todos los tiempos estudiados (30 min  $H(2) = 21.14$ ,  $p < 0.0001$ ; 90 min  $H(2) = 22.99$ ,  $p < 0.0001$ ; 180 min  $H(2) = 20.74$ ,  $p < 0.0001$ ) y ninguna diferencia entre grupos que recibieron el mismo entrenamiento y que fueron evaluados a distintos tiempos (Evocación:  $H(2) = 1.635$ ,  $p = 0.4416$ ; NoChoque:  $H(2) = 5.605$ ,  $p = 0.0606$ ; Exploración:  $H(2) = 1.026$ ,  $p = 0.5986$ ). Los animales del grupo NoChoque tardaron menos tiempo en

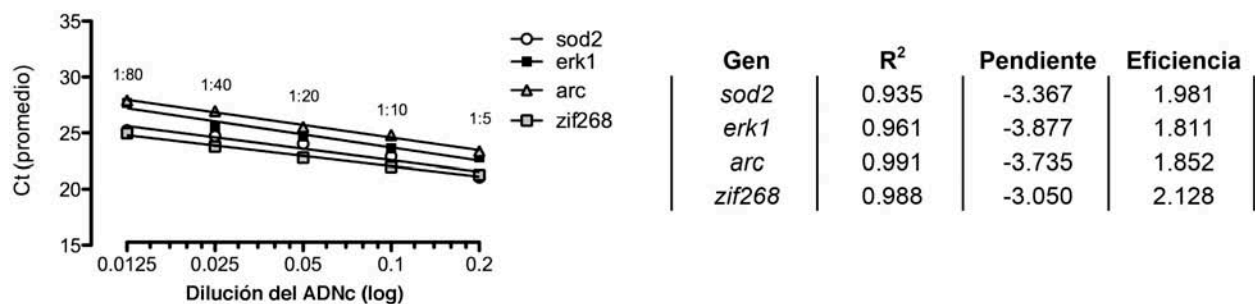
entrar al compartimento oscuro que el grupo Evocación en todos los tiempos estudiados (30 min  $p < 0.01$ ; 90 min  $p < 0.001$ ; 180 min  $p < 0.001$ ) (Figura 13). Además, corroboramos que los animales del grupo Exploración permanecieron el mismo tiempo en el compartimento iluminado que el tiempo que tomaron los animales del grupo Evocación en cruzar del compartimento iluminado al compartimento oscuro (Evocación vs Exploración: 30 min  $p > 0.05$ ; 90 min  $p > 0.05$ ; 180 min  $p > 0.05$ ).



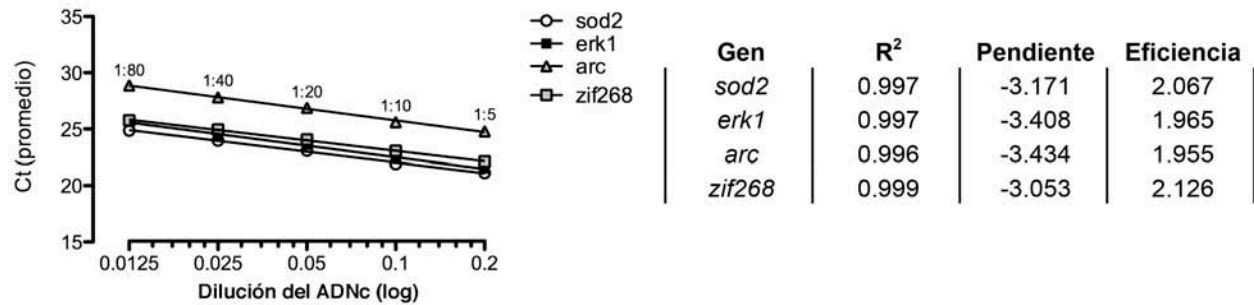
**Figura 13.** Latencias en la tarea de evitación inhibitoria correspondientes a los grupos sacrificados a los 30, 90 o 180 min después de la prueba de retención. Se muestran las medianas con el rango intercuartil de las latencias registradas el día del entrenamiento (Entrada y Escape) y el día de la prueba (Retención),  $n = 6-11$ . Como se describe en el método, los animales del grupo Exploración permanecieron en el compartimento iluminado un tiempo equivalente al grupo Evocación, para ellos la compuerta que divide los compartimentos permaneció siempre cerrada; por lo anterior los valores que presentan los animales del grupo Exploración deben interpretarse como un tiempo de permanencia en el compartimento iluminado. Los asteriscos en las latencias de retención indican diferencias significativas con respecto a Evocación y Exploración.  $***p < 0.001$ ,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ .

### 6.7.2.2 Curvas de eficiencia y elección del gen de referencia

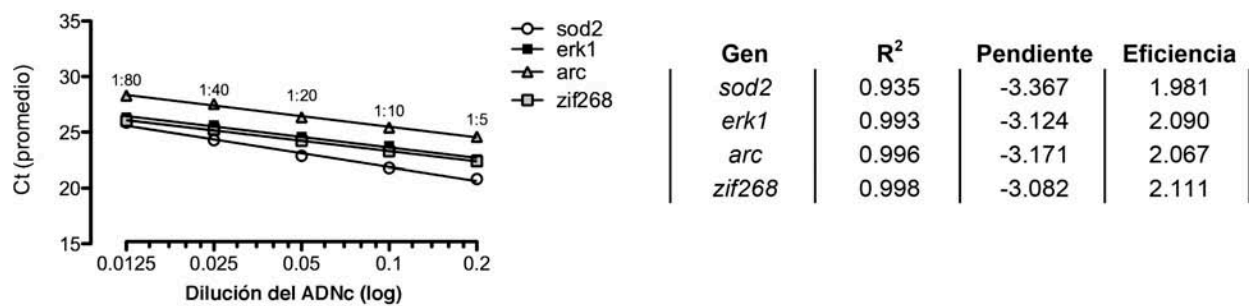
Debido al cambio en el método de extracción del ARN se analizó la eficiencia de los genes de interés ahora empleando diluciones menores del ADNc (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80) ya que, si bien con la técnica de Trizol se obtiene más ARN, los genes de interés fueron encontrados en menor abundancia. Encontramos que las eficiencias de los genes *erk1*, *arc* y *zif268* en las tres estructuras variaron entre 1.811 y 2.128 (Figura 14, Figura 15 y Figura 16). Al evaluar la curva de diluciones para la expresión de *chrm1* encontramos que las eficiencias fueron mayores a 3.0 tanto en la amígdala y el hipocampo, por lo anterior decidimos no continuar con el análisis de este gen ya que a pesar de que se variaron las condiciones de la corrida de PCR y las diluciones empleadas para generar la curva de eficiencia no se consiguieron mejores resultados. La dilución que elegimos para estudiar la expresión génica de manera individual del resto de los genes fue 1:10.



**Figura 14.** Curvas de eficiencia de muestras de estriado obtenidas a distintos tiempos después de la evocación. La gráfica de la izquierda muestra los valores de Ct promedio  $\pm$  el error estándar de la media obtenidos en la dilución de ADNc evaluada para cada gen. Los valores de ajuste de la regresión lineal ( $R^2$ ), de la pendiente de la curva de regresión así como el cálculo de la eficiencia para cada gen se muestran en la tabla de la derecha.



**Figura 15.** Curvas de eficiencia de muestras de amígdala obtenidas a distintos tiempos después de la evocación. La gráfica de la izquierda muestra los valores de Ct promedio  $\pm$  el error estándar de la media obtenidos en la dilución de cDNA evaluada para cada gen. Los valores de ajuste de la regresión lineal ( $R^2$ ), de la pendiente de la curva de regresión así como el cálculo de la eficiencia para cada gen se muestran en la tabla de la derecha.



**Figura 16.** Curvas de eficiencia de muestras de hipocampo obtenidas a distintos tiempos después de la evocación. La gráfica de la izquierda muestra los valores de Ct promedio  $\pm$  el error estándar de la media obtenidos en la dilución de ADN evaluada para cada gen. Los valores de ajuste de la regresión lineal ( $R^2$ ), de la pendiente de la curva de regresión así como el cálculo de la eficiencia para cada gen se muestran en la tabla de la derecha.

Al realizar el análisis de Normfinder encontramos que *sod2* fue el gen más estable para las tres estructuras en cuestión. La eficiencia de *sod2* fue de 1.981 en el estriado, 2.067 en la amígdala y 1.981 en el hipocampo (Tabla VII).

**Tabla VII . Análisis de Normfinder para la elección del gen de referencia para el Experimento 1B**

Estriado		Amígdala		Hipocampo	
Gen	Valor de estabilidad	Gen	Valor de estabilidad	Gen	Valor de estabilidad
<i>cycA</i>	0.007	<i>cycA</i>	0.005	<i>cycA</i>	0.006
<i>ywhaz</i>	0.005	<i>ywhaz</i>	0.005	<i>ywhaz</i>	0.005
<i>sod2</i>	0.003	<i>sod2</i>	0.003	<i>sod2</i>	0.003
Mejor gen	Valor de estabilidad	Mejor gen	Valor de estabilidad	Mejor gen	Valor de estabilidad
<i>sod2</i>	0.003	<i>sod2</i>	0.003	<i>sod2</i>	0.003
Mejor combinación de dos genes	Valor de estabilidad	Mejor combinación de dos genes	Valor de estabilidad	Mejor combinación de dos genes	Valor de estabilidad
<i>ywhaz</i> y <i>sod2</i>	0.004	<i>cycA</i> y <i>sod2</i>	0.003	<i>ywhaz</i> y <i>sod2</i>	0.003

### 6.7.2.3 Curva temporal de expresión génica en el estriado

Para facilidad de identificación de ahora en adelante nos referiremos al grupo en cuestión primero indicando el tipo de entrenamiento seguido del tiempo estudiado, por ejemplo Evocación-30 para el grupo Evocación cuya expresión génica fue evaluada 30 min después de la evocación.

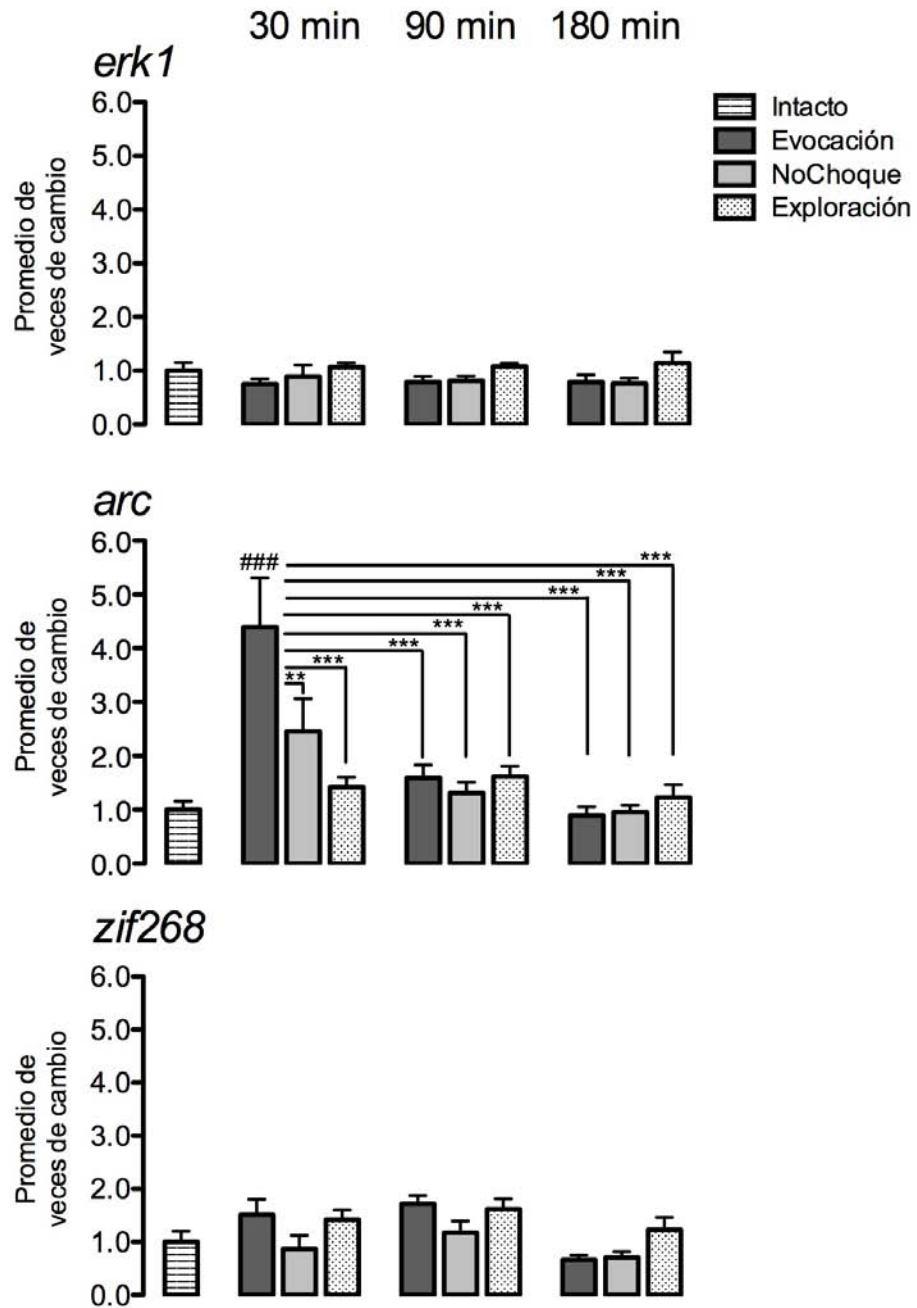
En la expresión de *erk1* encontramos que el ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas en el factor grupo ( $F_{(2,52)} = 5.20$ ,  $p = 0.0087$ ); el factor tiempo no fue significativo ( $F_{(2, 52)} = 0.0052$ ,  $p=0.99$ ) así como tampoco lo fue la interacción entre factores ( $F_{(4, 52)} = 0.192$ ,  $p=0.94$ ). Al realizar las comparaciones considerando el factor grupo no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tipos de entrenamiento (NoChoque vs Exploración  $p= 0.616$ ; Evocación vs Exploración  $p= 0.205$ ; Evocación vs NoChoque  $p= 0.708$ ). El ANOVA de una vía que incluyó al grupo Intacto no mostró diferencias significativas ( $F_{(9,58)} = 1.257$ ,  $p=0.2798$ ) (Figura 17).

En *arc* encontramos que el factor tiempo, grupo y la interacción entre ellos fueron significativos (tiempo:  $F_{(2,52)} = 15.08$ ,  $p<0.0001$ ; grupo:  $F_{(2, 52)} = 3.68$ ,  $p=0.03$ ; tiempo x grupo:  $F_{(4,52)} = 4.8$ ,  $p=0.002$ ) (Figura 17). Al realizar las comparaciones pareadas, la

expresión en el grupo Evocación-30 fue mayor que los grupos NoChoque-30 y Exploración-30 ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente); también la expresión de *arc* en Evocación-30 fue mayor que Evocación-90, Evocación-180, NoChoque-90, NoChoque-180, Exploración-90 y Exploración-180 ( $p < 0.001$  para cada comparación). Al realizar el ANOVA de una sola vía para incluir al grupo Intacto en las comparaciones encontramos diferencias significativas ( $F_{(9,59)} = 7.181$ ,  $p < 0.0001$ ), sólo el grupo Evocación-30 fue diferente a Intacto ( $p < 0.001$ ). Estos resultados nos muestran que la expresión de *arc* en el estriado se incrementó significativamente sólo en el grupo Evocación.

En *zif268* encontramos que los factores tiempo y grupo fueron significativos (tiempo:  $F_{(2, 52)} = 8.09$ ,  $p = 0.0009$ ; grupo:  $F_{(2, 52)} = 5.06$ ,  $p = 0.0098$ ) mientras que la interacción entre ellos no lo fue ( $F_{(4, 52)} = 1.19$ ,  $p = 0.3239$ ) (Figura 17). Al analizar de manera independiente el factor tiempo no encontramos diferencias significativas entre los tiempos estudiados (30 vs 90  $p = 0.774$ ; 30 vs 180  $p = 0.804$ ; 90 vs 180  $p = 0.376$ ). Asimismo no hubo diferencias entre los grupos (Evocación vs NoChoque  $p = 0.0563$ ; Evocación vs Exploración  $p = 0.9460$ ; NoChoque vs Exploración  $p = 0.1418$ ). El ANOVA de una vía que incluyó a Intacto fue significativo ( $F_{(9,59)} = 3.577$ ,  $p = 0.0013$ ) sin embargo al realizar las comparaciones pareadas ningún grupo difirió de Intacto. Entonces, la expresión de *zif268* en el estriado no difiere significativamente de la observada basalmente.





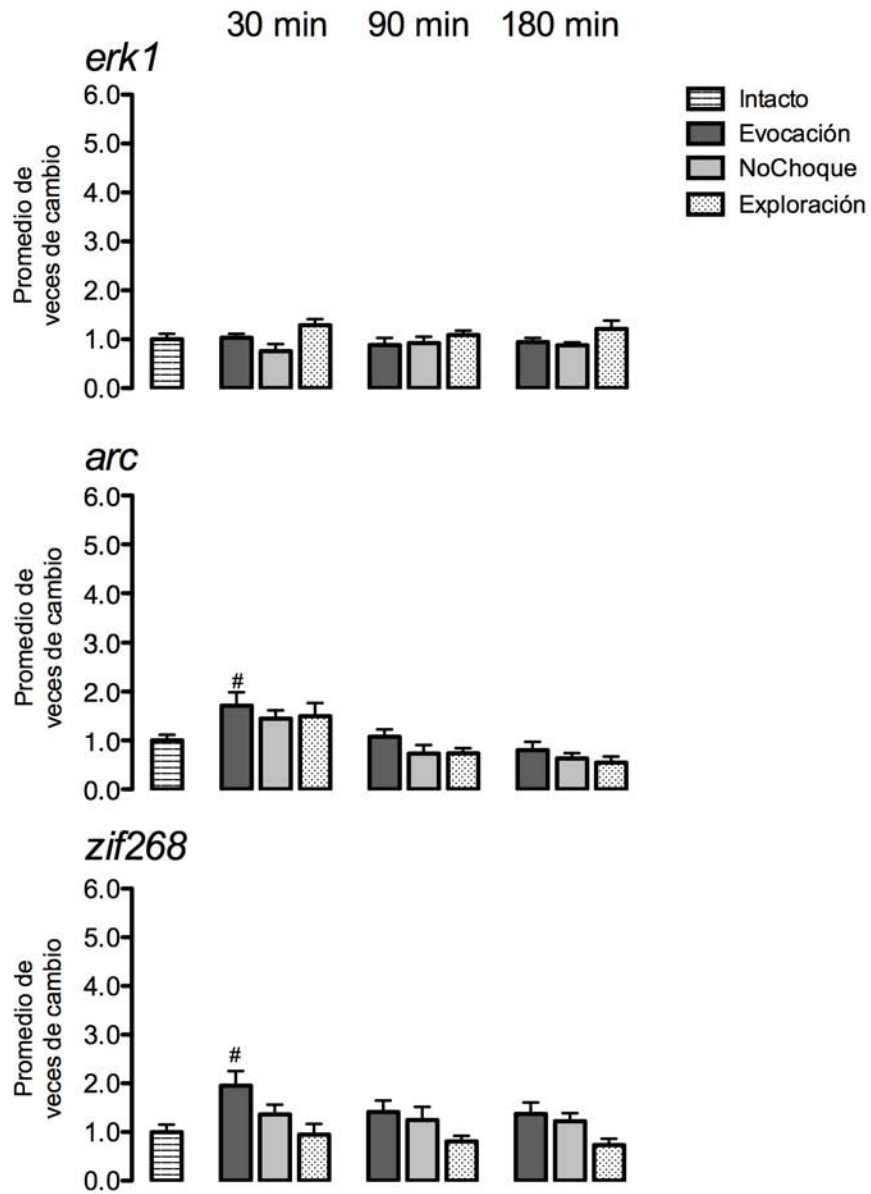
**Figura 17.** Expresión génica en el estriado después de que transcurrieron 30, 90 o 180 min de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra el promedio de veces de cambio  $\pm$  el error estándar de la media. Los valores son expresados con respecto a Intacto. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  vs Intacto;  $n = 6-8$ .

#### 6.7.2.4 Curva temporal de expresión génica en la amígdala

En *erk1* encontramos un efecto significativo en el ANOVA de dos vías en el factor grupo ( $F_{(2, 58)} = 6.37$ ,  $p=0.0031$ ) mientras que los factores tiempo y la interacción grupo x tiempo no fueron significativos (tiempo:  $F_{(2,58)}= 0.18$ ,  $p=0.83$ ; grupo x tiempo :  $F_{(4, 58)} = 0.70$ ,  $p = 0.59$ ) (Figura 18). El análisis del factor grupo mostró que *erk1* tuvo una expresión diferente entre NoChoque y Exploración (NoChoque vs Exploración  $p= 0.00487$ ), el grupo Evocación no difirió de los otros grupos (Evocación vs NoChoque  $p= 0.20662$ ; Evocación vs Exploración  $p= 0.29192$ ). El ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas ( $F_{(9,65)} = 1.773$ ,  $p = 0.09$ ) reflejando así que ningún cambio en la expresión génica de *erk1* en la amígdala es mayor al observado en condiciones basales.

En *arc* encontramos que el factor tiempo fue significativo ( $F_{(2,58)} = 19.71$ ,  $p<0.0001$ ) mientras que el factor grupo y la interacción tiempo x grupo no mostraron significancia estadística (grupo:  $F_{(2,58)} = 2.15$ ,  $p= 0.125$ ; tiempo x grupo:  $F_{(4,58)} = 0.082$ ,  $p= 0.98$ ) (Figura 18). Al analizar el factor tiempo encontramos que la expresión de *arc* a los 30 min difirió a la expresión a los 90 y 180 min (30 vs 90  $p= 0.012$ ; 30 vs 180  $p= 0.00112$ ; 90 vs 180  $p=0.76289$ ). El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas ( $F_{(9,65)} = 5.207$ ,  $p<0.0001$ ), sólo el grupo Evocación-30 fue diferente a Intacto ( $p<0.05$ ).

La expresión de *zif268* mostró diferencias significativas sólo en el factor grupo (grupo:  $F_{(2,58)}= 8.74$ ,  $p= 0.0005$ , tiempo:  $F_{(2,58)}= 1.86$ ,  $p= 0.16$ , tiempo x grupo:  $F_{(4,58)} = 0.408$ ,  $p= 0.801$ ). Cuando comparamos los grupos solo el grupo Evocación difirió de Exploración (Evocación vs Exploración  $p= 0.0034$ ; NoChoque vs Exploración  $p= 0.3707$ ; Evocación vs NoChoque  $p= 0.1218$ ). El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas ( $F_{(9,64)}= 2.802$ ,  $p= 0.0078$ ), la expresión de *zif268* en Evocación-30 fue mayor con respecto a Intacto ( $p<0.05$ ).



**Figura 18.** Expresión génica en la amígdala después de que transcurrieron 30, 90 o 180 min de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra el promedio de veces de cambio  $\pm$  el error estándar de la media. Los valores son expresados con respecto a Intacto. #  $p < 0.05$  vs Intacto;  $n = 7-8$ .

#### 6.7.2.5 Curva temporal de expresión génica en el hipocampo

En la expresión de *erk1* no encontramos efectos significativos en el ANOVA de dos vías (tiempo:  $F_{(2,60)} = 0.27$ ,  $p = 0.76$ ; grupo:  $F_{(2, 60)} = 0.84$ ,  $p= 0.43$ ; tiempo x grupo:  $F_{(4,60)} = 0.26$ ,  $p=0.89$ ). Tampoco en el ANOVA de una vía encontramos un efecto significativo ( $F_{(9,67)} = 0.53$ ,  $p= 0.84$ ) (Figura 19).

Por otra parte, en la expresión de *arc* encontramos un efecto significativo del factor tiempo ( $F_{(2,60)} = 9.35$ ,  $p = 0.0003$ ) mientras que el factor grupo y la interacción tiempo x grupo no fueron significativos (grupo:  $F_{(2,60)} = 0.88$ ,  $p = 0.4199$ ; tiempo x grupo:  $F_{(4,60)} = 1.29$ ,  $p = 0.28$ ). Cuando comparamos los distintos tiempos sólo encontramos diferencias en la expresión de *arc* entre los 30 y los 180 min (30 vs 90  $p= 0.0571$ ; 30 vs 180  $p= 0.0287$ ; 90 vs 180  $p= 0.9375$ ). El ANOVA de una vía mostró un efecto significativo ( $F_{(9, 67)} = 4.327$ ,  $p = 0.0002$ ); la expresión en NoChoque-30, Exploración-30 y Evocación-30 fue diferente a la observada en Intacto ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ ,  $p<0.001$ , respectivamente).

En la expresión de *zif268* encontramos que el ANOVA de dos vías no mostró efectos significativos (tiempo:  $F_{(2,60)} = 0.08$ ,  $p= 0.91$ ; grupo:  $F_{(2, 60)} = 2.78$ ,  $p= 0.069$ ; tiempo x grupo:  $F_{(4,60)} = 1.16$ ,  $p= 0.33$ ). Al realizar el ANOVA de una vía encontramos un efecto significativo ( $F_{(9,67)} = 2.472$ ,  $p= 0.0168$ ); la expresión en Evocación-30, NoChoque-90 y Evocación-180 fue mayor que en el grupo Intacto ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ,  $p<0.05$ ).

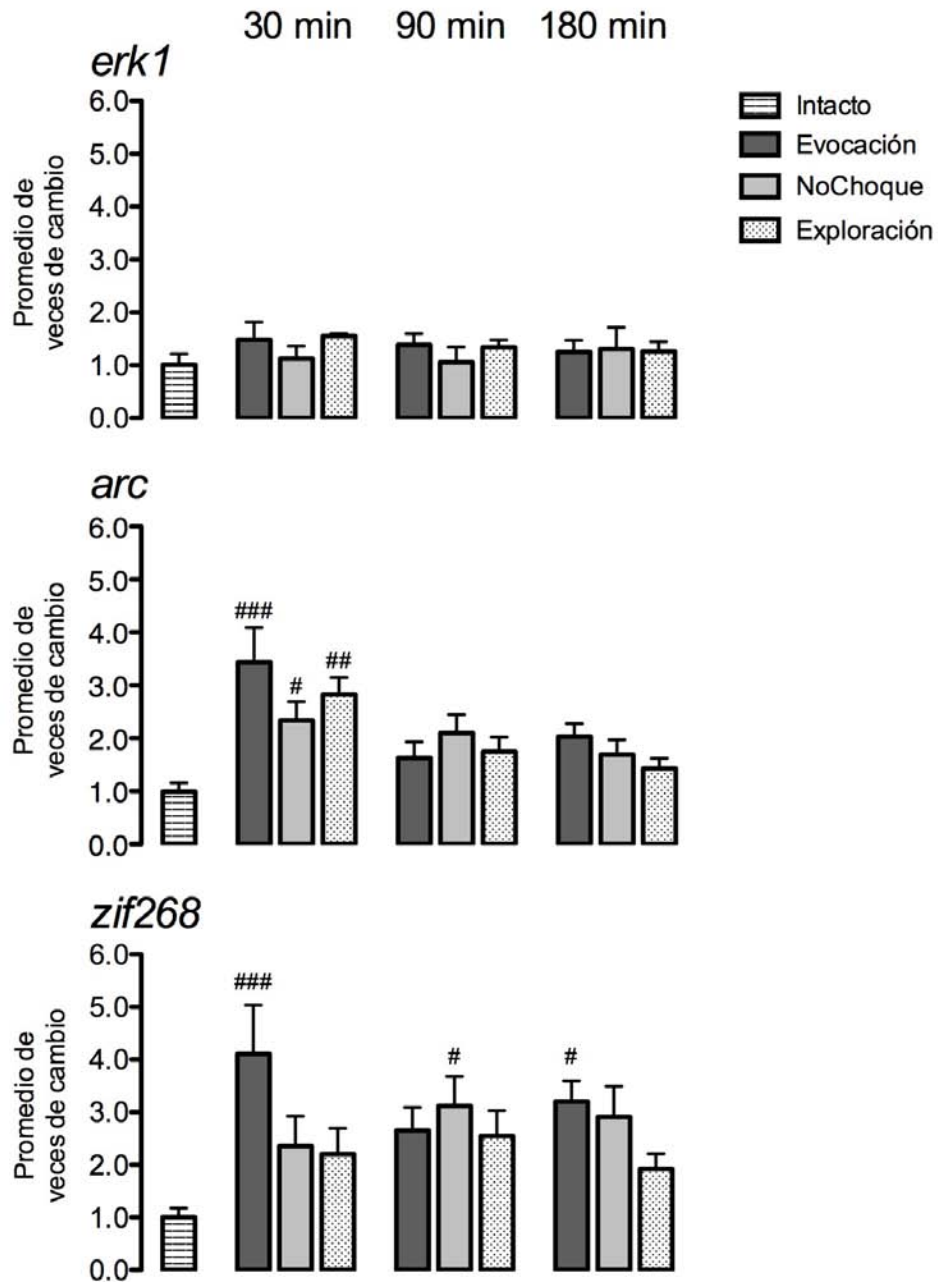
#### 6.7.2.6 Comparación entre los resultados obtenidos a los 90 min después de la evocación (Experimento1A) y la curva temporal de expresión (Experimento1B)

Para comparar la consistencia de los resultados obtenidos cuando se estudió la expresión génica solo a los 90 min después de la evocación (Experimento1A) con respecto a los datos obtenidos a este mismo tiempo en el estudio de la curva temporal (Experimento1B) se compararon los grupos comunes a ambos experimentos (Evocación, NoChoque e Intacto) y se realizaron las comparaciones estadísticas correspondientes.

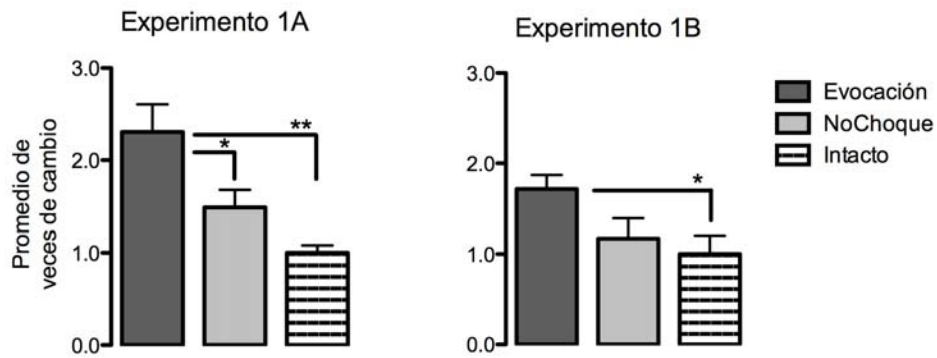
La expresión de *zif268* en el estriado fue similar en ambos experimentos, encontramos que el ANOVA del Experimento1A min fue significativo ( $F_{(2, 27)} = 9.814$ ,  $p=0.0006$ ) al igual que ocurrió con los datos del Experimento1B ( $F_{(2, 18)} = 3.659$ ,  $p=0.0464$ ). Las comparaciones *post-hoc* mostraron que en el experimento Experimento1A el grupo

Evocación mostró una mayor expresión con respecto a los grupos NoChoque e Intacto ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente) mientras que en el Experimento1B el grupo evocación solo difirió de Intacto ( $p < 0.05$ ) (Figura 20).

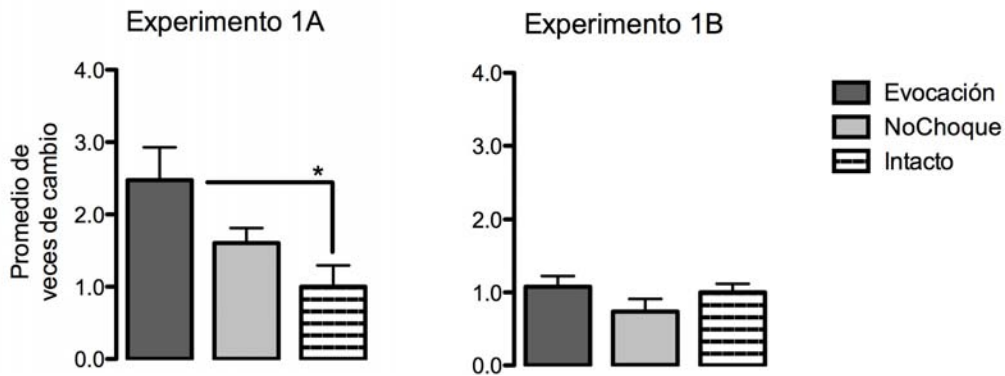
Al comparar la expresión de *arc* en amígdala encontramos resultados disímiles entre ambos experimentos; el ANOVA mostró diferencias significativas en el Experimento1A ( $F_{(2,24)} = 4.634$ ,  $p = 0.0199$ ) mientras que el análisis no fue significativo en el Experimento1B ( $F_{(2,20)} = 1.476$ ,  $p = 0.2524$ ). En el Experimento1A el grupo Evocación mostró una mayor expresión de *arc* solo con respecto a Intacto (Figura 21).



**Figura 19.** Expresión génica en el hipocampo después de que transcurrieron 30, 90 o 180 min de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria. Se muestra el promedio de veces de cambio  $\pm$  el error estándar de la media. Los valores son referenciados con respecto al grupo Intacto. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs Intacto;  $n = 7-8$ .



**Figura 20.** Comparación de la expresión de *zif268* en el estriado en el experimento 1A y 1B. Se muestran los datos de ambos experimentos correspondientes a los 90 min después de la evocación, se incluyeron sólo los grupos comunes a los dos experimentos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



**Figura 21.** Comparación de la expresión de *arc* en la amígdala en el experimento realizado a los 90 min y la curva temporal. Se muestran los datos de ambos experimentos correspondientes a los 90 min después de la evocación, se incluyeron sólo los grupos comunes a los dos experimentos. \* $p < 0.05$ .

## 6.8 Discusión

Encontramos que la expresión de *chrm1* en el estriado y en la amígdala no cambió significativamente entre los grupos (Figura 11 y Figura 12). Esto nos sugiere que el incremento en la proteína M1 observado después de la evocación (Ortega et al., 1996) no es precedido por un aumento en la expresión de su ARNm. Para descartar que el incremento en M1 causado por la evocación efectivamente no requiera de un aumento en la expresión de su gen sería conveniente evaluar la expresión de *chrm1* a los 150 min después de la evocación como lo realizado por Ortega et al. (1996) donde estudiaron su

proteína. El trabajo de Ortega et al. (1996) también mostró que el incremento en el receptor M1 después de la evocación depende de la intensidad de choque eléctrico empleada durante el entrenamiento; mientras que una intensidad baja produce un incremento en el estriado, hipocampo y corteza temporo-parietal, una intensidad mayor produce un incremento sólo en la corteza temporo-parietal y la amígdala. Diversos trabajos han mostrado que el bloqueo del sistema colinérgico altera la evocación y la extinción (Boccia, Blake, Baratti, & McGaugh, 2009; Maruki, Izaki, Akema, & Nomura, 2003; Prado-Alcalá et al., 1985; Santini, Sepulveda-Orengo, & Porter, 2012). Además se ha observado una liberación de acetilcolina en la corteza prefrontal durante la primera reexposición al contexto donde se aprendió (Izaki, Hori, & Nomura, 2001). Prado-Alcalá, Haiek, Rivas, Roldán-Roldán y Quirarte (1994) mostraron que la administración sistémica de un antagonista colinérgico promueve la evocación de la memoria en animales sometidos a un protocolo de extinción siempre y cuando la intensidad empleada durante el entrenamiento haya sido baja o moderada ya que el mismo tratamiento no afecta la conducta de animales que recibieron una intensidad alta de entrenamiento. En la presente tesis empleamos una intensidad moderada de choque (1mA) y evaluamos la expresión de *chrm1* en el estriado y la amígdala después de la evocación; sería importante entrenar a animales bajo distintas intensidades de choque y evaluar la expresión de *chrm1* en estriado, hipocampo, corteza temporo-parietal y la amígdala para evaluar si la expresión de este gen depende de la intensidad de choque empleada durante el entrenamiento y de la estructura en estudio. En conjunto, los trabajos anteriores demuestran que el sistema colinérgico se activa por la evocación de memorias, sin embargo nuestros datos nos indican que esta activación no ocurre a nivel genómico por lo menos en el estriado y en la amígdala a los 90 min después de la evocación; es decir, la evocación en la tarea de evitación inhibitoria activa receptores de acetilcolina y se producen nuevos receptores M1 partiendo del ARNm de *chrm1* que existe basalmente en la célula.

En el estudio realizado a los 90 min después de la evocación (Experimento1A) encontramos que la expresión de *erk1* no mostró cambios ni en estriado ni en amígdala (Figura 11 y Figura 12). El estudio temporal de la evocación (Experimento1B) tampoco mostró cambios a ningún tiempo en el estriado ni en el hipocampo (Figura 17 y Figura 19) mientras que en la amígdala se observó un cambio en el factor grupo entre NoChoque y Exploración (Figura 18). Diversos estudios han mostrado que la evocación no cambia los



niveles de proteína de ERK (Huang et al., 2010; Lin, Wang, Tai, & Tsai, 2010) y tampoco la consolidación altera la cantidad de proteína presente (Villarreal & Barea-Rodriguez, 2006); nuestros resultados muestran que la expresión génica de *erk1* tampoco es alterada sustancialmente por la evocación. Simonyi, Murch y Sun (2003) evaluaron la expresión de *erk2* en ratas viejas y observaron solo un cambio en CA3, los autores sugieren que los cambios en el ARNm de *erk2* no están relacionados con el proceso de envejecimiento y apoyan la idea de que en el envejecimiento existe una reducción pero a nivel de la actividad enzimática de ERK. Estudios en ratones knock-out para *erk1* mostraron que la eliminación de este gen no tiene efectos en la adquisición o evocación de diferentes paradigmas conductuales ni en la LTP (Selcher et al., 2001). Por otra parte trabajos donde se evalúa la fosforilación después de la evocación y de la adquisición demuestran un incremento en las versiones fosforiladas de ERK1 y ERK2 (Huang et al., 2010; Villarreal & Barea-Rodriguez, 2006), además el bloqueo de la fosforilación de estas enzimas causa un deterioro en la evocación (Huang et al., 2010; Szapiro et al., 2000). Los trabajos anteriores junto con nuestros resultados apoyan la idea de que la principal modulación que procesos cognoscitivos ejercen sobre ERK es a nivel de su fosforilación mientras que la expresión génica de *erk1* ni la síntesis de su correspondiente proteína no tienen un papel relevante. Nuestros resultados también sugieren que *erk1* podría ser un buen gen de referencia para la técnica de PCR en tiempo real ya que no se ve sustancialmente afectado por el procedimiento conductual, por la estructura cerebral ni por el tiempo en el que se evalúa.

A pesar de que en el experimento realizado a los 90 min (Experimento1A) no se observaron cambios en *arc* en el estriado, el estudio temporal (Experimento1B) nos mostró que la expresión de *arc* en el estriado a los 30 min después de la evocación se asocia claramente a la evocación de la tarea de evitación inhibitoria (Figura 11 y Figura 17). A los 30 min observamos un incremento significativo en la expresión de *arc* en el grupo Evocación que fue mayor con respecto al resto de los grupos; ninguno de los otros grupos difirió significativamente con respecto a Intacto o entre ellos. Nuestros resultados demuestran que la expresión de *arc* en el estriado a los 30 min se induce por la evocación de la tarea de evitación inhibitoria, que implica una previa asociación entre el choque y el contexto, y que la expresión de *arc* en el estriado no es inducida por la mera reexposición a un contexto. Este cambio en la expresión de *arc* sólo fue observado a los 30 min después de la evocación lo que nos habla de una rápida regulación en la expresión de *arc*

en el estriado como había sido mostrado para el hipocampo (Besnard et al., 2013; Guzowski et al., 2001). El trabajo de Vazdarjanova et al. (2006) mostró que la exploración y la estimulación por choques electroconvulsivos inducen la expresión de *arc* en el estriado dorsomedial y dorsolateral; esta expresión de *arc* ocurre en neuronas gabaérgicas que expresan la enzima CAMKII. El estriado dorsomedial se comunica con regiones corticales de asociación mientras que el dorsolateral recibe información de cortezas sensoriales y sensorimotoras (Yin & Knowlton, 2006; Yin et al., 2008). Debido a las entradas de información de múltiples modalidades, el estriado dorsal podría estar procesando información correspondiente a la evocación de distintos aspectos de la tarea de evitación inhibitoria como recordar que el ejercer una serie de movimientos específicos (i.e. entrar al compartimento oscuro) provoca una consecuencia negativa y reconocer que el contexto con poca iluminación se asocia con una consecuencia negativa.

El análisis a los 90 min (Experimento1A) en el estriado nos mostró que la expresión de *zif268* fue mayor en el grupo Evocación con respecto al resto de grupos control (Figura 11). Cuando realizamos la curva temporal de expresión (Experimento1B) encontramos que la expresión de *zif268* no difirió significativamente en ninguno de los grupos (Figura 17). Al comparar los resultados del Experimento1A y Experimento1B incluyendo sólo a los grupos comunes a los 2 experimentos (Evocación, NoChoque e Intacto) encontramos resultados similares; la expresión en Evocación fue mayor con respecto a Intacto en ambos experimentos mientras que en el Experimento1A el grupo Evocación difirió adicionalmente con respecto a NoChoque (Figura 20). Esta comparación nos indica que la expresión de *zif268* fue mayor en animales sometidos a la evocación en la tarea de evitación inhibitoria sólo con respecto a animales que permanecen en su caja habitación pero no con respecto a animales reexpuestos al contexto; esto sugiere que la expresión de *zif268* en el estriado dorsal se induce por la reexposición a un contexto. Existen estudios de la expresión de *zif268* después la evocación en otra región del estriado, el zona central del núcleo accumbens. La evocación del condicionamiento de miedo al contexto y del condicionamiento de miedo al tono provoca un incremento en la expresión de *zif268* en el zona central del núcleo accumbens asociado efectivamente a la evocación (Thomas et al., 2002). Los autores proponen que el aumento en la expresión de *zif268* se debe a que este gen está involucrado en el procesamiento de información referente a claves discretas como un tono y referente a información contextual; el procesamiento de información

relacionada a contextos aversivos estaría modulada a su vez por la conexión que tiene con el hipocampo. Nuestro trabajo sugiere que la parte dorsal del estriado también estaría procesando información debida a la asociación entre el contexto y la consecuencia, sería importante estudiar de manera simultánea la expresión en el estriado dorsal y ventral y comparar así si la expresión génica se modula de manera similar en ambas regiones.

Al estudiar la expresión génica en la amígdala encontramos que a los 90 min después de la evocación (Experimento1A) se observó un cambio en *arc* entre Intacto y Evocación mientras que la expresión de *zif268* no sufrió cambios en ninguno de los grupos (Figura 12). Al realizar la curva temporal (Experimento1B) encontramos que la expresión de *arc* no estuvo asociada a la evocación en ninguno de los tiempos estudiados ya que a pesar de que a los 30 min la expresión en Evocación fue mayor que Intacto, esta expresión no difirió con respecto a los otros grupos control (Figura 18). Al comparar los resultados del Experimento1A y Experimento1B observamos resultados diferentes; mientras que en el experimento realizado a los 90 min (Experimento1A) observamos un incremento significativo en Evocación con respecto a Intacto; no observamos ningún cambio significativo en el experimento de la curva temporal (Experimento1B) (Figura 21). Cuestiones técnicas podrían haber contribuido a estas diferencias; como mencionamos en el método, al emplear la técnica de extracción de ARN por Trizol se obtiene una mayor cantidad de ARNm pero la abundancia de los transcritos de interés fue menor (se tuvieron que evaluar muestras más concentradas de ADNc en el experimento de la curva temporal para lograr una detección adecuada) (Figura 10 y Figura 15). Además hay que considerar que los genes de referencia empleados en uno y otro experimento fueron diferentes (*cycA* y *ywhaz* para el Experimento1A y *sod2* para el Experimento1B) esto debido a que el análisis de Normfinder se realizó para cada experimento incluyendo todos los grupos de interés a comparar. Tomando en conjunto los resultados de *arc* en el Experimento1A y Experimento1B, nuestros datos muestran un incremento en la expresión de *arc* en la amígdala 30 min después de que los sujetos son reexpuestos a un contexto independientemente de que ese contexto haya estado asociado a una consecuencia aversiva. Yamasaki et al. (2012) han reportado un incremento en la expresión génica de *arc* en la amígdala lateral después de que los animales son sometidos a evocar la tarea de condicionamiento de miedo al contexto. Ellos proponen que la actividad de *arc* en la amígdala lateral sirve para mantener la memoria a través de la reconsolidación. Las

diferencias entre lo reportado por Yamasaki et al. (2012) y los resultados de la presente tesis pueden ser explicados por los grupos que se emplearon como control. En el trabajo de Yamasaki et al. (2012) los animales sometidos a la evocación en el condicionamiento de miedo al contexto son comparados con respecto a animales que siempre permanecieron en su caja habitación, sus resultados no permiten saber si la expresión se indujo por la sola reexposición al contexto ni tampoco si se debió a la evocación de la memoria. En la presente tesis nosotros adicionalmente incluimos tres grupos control para asegurarnos de que la reactivación de la memoria es la que induce los cambios (NoEvocación), un grupo que nos indica que sólo animales que estuvieron expuestos al choque y al contexto presentan una memoria (NoChoque) y un grupo de animales que nos permite identificar que los cambios observados no se deben a una reexposición prolongada al contexto (Exploración). Nuestros resultados nos permiten decir que si bien la expresión de *arc* es mayor en los animales sometidos a evocar la tarea de evitación inhibitoria con respecto a un grupo de animales que sólo permanecen en su caja habitación, esta expresión es similar a la de animales sólo reexpuestos a un contexto. Por otra parte, estudios donde evalúan cambios en la proteína de Arc encuentran que efectivamente hay un aumento de ella en animales sometidos a evocar la tarea de condicionamiento de miedo al contexto y de miedo al tono (Maddox & Schafe, 2011; Mamiya et al., 2009). Se ha observado que puede existir un incremento en la proteína de Arc sin requerirse la expresión de su gen; después del aprendizaje en la tarea de evitación inhibitoria se encuentra un incremento en Arc en el hipocampo sin que hayan aumentado los niveles de su ARNm (McIntyre et al., 2005); sin embargo desconocen los detalles de este fenómeno. Al estudiar la tarea de evitación inhibitoria nuestros resultados indican que la síntesis del ARNm de *arc* se induce en la amígdala por la reexposición al contexto; sin embargo el trabajo de McIntyre et al. (2005) deja abierta la posibilidad de que a nivel de proteína exista una mayor expresión en animales que evocan debido a que los incrementos en el ARNm y la proteína de Arc no siempre están correlacionados.

La expresión de *zif268* en la amígdala a los 30 min después de la evocación podría estar relacionada con la evocación ya que la expresión de este gen fue mayor en el grupo Evocación-30 con respecto a Intacto; además el factor grupo fue significativo donde Evocación mostró una mayor expresión que Exploración (Figura 18). Nuestros resultados obtenidos para *zif268* concuerdan con lo reportado por Hall et al. (2001a) en la evocación

de los condicionamientos de miedo al tono y al contexto, apoyando así la idea de que la expresión de este gen en la amígdala se induce al evocar una tarea que posee un componente aversivo. La amígdala ha sido vista como un modulador de la evocación (Roosendaal, Griffith, Buranday, de Quervain, & McGaugh, 2003; Roosendaal et al., 2004) sin embargo, nuestros resultados sugieren que la amígdala no sólo tiene un efecto modulador sino que también se activa durante la evocación y a través de la acción de *zif268* estaría implicada en mantener o modificar la información almacenada. De hecho, los primeros trabajos que retomaron la idea de que una memoria reactivada puede ser modificada fueron realizados en la amígdala, donde se observó que después de la evocación la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas puede desestabilizar esa memoria (Nader, Schafe, & Le Doux, 2000).

En el hipocampo encontramos que la expresión de *arc* en a los 30 min fue mayor que lo observado a los 180 min; además la expresión en Evocación-30 NoChoque-30 y Exploración-30 fue mayor con respecto a Intacto (**Figura 19**). Estos resultados nos indican que la actividad de *arc* en el hipocampo se induce por la reexposición breve a un contexto y no por la evocación en la tarea de evitación inhibitoria. Es interesante notar que una reexposición por menos de 60 seg induce cambios grandes de la expresión de este gen (obsérvense las latencias de retención en **Figura 13** y la expresión de *arc* en NoChoque en **Figura 19**). Múltiples trabajos han demostrado que la expresión del gen *arc* en el hipocampo se induce por la exploración de un contexto (Guzowski et al., 2006, 1999; Vazdarjanova et al., 2002), además la reexposición a un contexto sigue induciendo la expresión de este gen siempre y cuando no exista una reexposición repetida en el mismo día (Guzowski et al., 2006). En el condicionamiento de miedo al contexto se ha observado que la síntesis de la proteína de Arc se induce por la evocación (Besnard et al., 2013; Mamiya et al., 2009); esta expresión es mayor en animales que evocan la tarea que en animales que solo fueron reexpuestos al contexto y que no recibieron choque eléctrico durante el entrenamiento. Nuestros resultados muestran que a nivel de ARNm, *arc* se induce en el hipocampo por la reexposición a la cámara de entrenamiento de la tarea de evitación inhibitoria independientemente si durante el entrenamiento los animales recibieron choque o no; además, la inducción de *arc* se promueve con una reexposición de menos de 60 seg.

La expresión de *zif268* en el hipocampo aumentó en los grupos Evocación- 30, NoChoque-90 y Evocación-180 con respecto a Intacto (Figura 19). Estos resultados sugieren que la expresión de *zif268* podría haber sido inducida también por la reexposición a un contexto, aunado a esto parece que los cambios en este gen se mantienen por más tiempo que en el caso de *arc*. La síntesis sostenida de la proteína Zif268 ha sido estudiada en los trabajos de Besnard et al. (2013) y Lee et al. (2004), en el primero observan un aumento a los 15, 30 y 60 min después de la evocación y en el segundo observan un incremento a los 120 min. En conjunto podemos sugerir que la expresión de *arc* y *zif268* en el hipocampo se induce por el reconocimiento de la cámara de evitación inhibitoria y la regulación a la baja de *arc* es más rápida que la regulación de *zif268*.

En resumen, este estudio de expresión génica muestra que la transcripción de genes de expresión temprana en el estriado se induce por la evocación de la asociación de un contexto y una previa consecuencia negativa, una expresión similar fue observada en la amígdala mientras que la reexposición a un contexto induce la expresión génica en el hipocampo. La expresión génica en el estriado y la amígdala después de la evocación podría ser clave para modificar información relacionada con la asociación del contexto y la consecuencia aversiva que se formó en la tarea de evitación inhibitoria.

## **7 EXPERIMENTO 2. EFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS SOBRE LA EXTINCIÓN DE LA TAREA DE EVITACIÓN ACTIVA**

### **7.1 ANTECEDENTES**

7.1.1 La evocación puede inducir extinción, reconsolidación o actualización de la información

Se propone que la evocación de una memoria puede llevar a la reconsolidación, a su actualización o a la extinción de la conducta aprendida (Eisenberg, Kobil, Berman, & Dudai, 2003; Rodríguez-Ortiz, De la Cruz, Gutiérrez, & Bermudez-Rattoni, 2005). El que ocurra un proceso u otro después de la evocación parece depender de la duración y número de reexposiciones al contexto donde ocurrió al aprendizaje, así como de la información disponible al momento de evocar. Si el número de sesiones de evocación es bajo o el tiempo de reactivación es breve entonces la memoria original es la que va a predominar y será susceptible a la reconsolidación, por el contrario si el número de exposiciones es largo o el tiempo de reexposición al contexto es prolongado el proceso que predominará será el de la extinción (Eisenberg et al., 2003; Mamiya et al., 2009; Pedreira & Maldonado, 2003; Suzuki et al., 2004). Por otra parte, si durante la evocación se incluye nueva información relevante para el sujeto entonces la memoria original puede ser actualizada, por el contrario si el contexto donde se evoca no provee nueva información entonces la memoria original permanece estable y no es susceptible a distintos tratamientos que se sabe producen amnesia (Rodríguez-Ortiz et al., 2005; Rossato et al., 2007; Winters, Tucci, & DaCosta-Furtado, 2009).

La extinción ha sido descrita consistentemente en diversas conductas aprendidas mientras que para que la reconsolidación y la actualización de la memoria puedan ser observadas se necesita de condiciones específicas (Quirk & Mueller, 2007). A continuación profundizaremos en el proceso de extinción y posteriormente mencionaremos brevemente las características de la reconsolidación y de la actualización de la información.

### 7.1.2 Características de la extinción

La extinción es una forma de aprendizaje en el que los sujetos disminuyen la intensidad o frecuencia de la respuesta aprendida debido a que esta conducta ya no predice una consecuencia (Milad & Quirk, 2012; Pavlov, 1927). En el condicionamiento clásico la extinción se observa después de la presentación repetida del estímulo condicionado sin la presentación del estímulo incondicionado, en el caso del condicionamiento instrumental la omisión repetida del reforzador provoca la disminución de la conducta aprendida (Lattal & Lattal, 2012).

La recuperación espontánea, la renovación, la reinstauración y la rápida readquisición son manipulaciones experimentales que tienen lugar después de la extinción, que demuestran que este proceso es un nuevo aprendizaje que no borra la memoria original sino que impide su expresión (Myers & Davis, 2006). La recuperación espontánea no requiere de ningún tipo de entrenamiento y se observa como una reaparición de la conducta extinta una vez transcurrido cierto tiempo (Myers & Davis, 2006). Se sugiere que la recuperación espontánea puede deberse a una desinhibición temporal de la conducta (Konorski, 1967; Pavlov, 1927) o a una mejora en el proceso de atención que permite la identificación de más elementos del contexto y con ello la reaparición de la conducta aprendida (Bouton, 1993). La renovación se refiere a la reaparición de la conducta extinta cuando los sujetos son evaluados en un contexto diferente a donde se llevó a cabo la extinción, con la presencia de algunos elementos presentes durante el aprendizaje (Myers & Davis, 2006). En la reinstauración, la conducta reaparece después de que los sujetos son reexpuestos al estímulo incondicionado; la reaparición de la conducta puede observarse hasta 24 h después de la exposición al estímulo incondicionado (Rescorla & Heth, 1975). Durante el rápido reaprendizaje ocurre una fácil reaparición de la conducta debido a que se vuelven a presentar de manera conjunta el estímulo condicionado y el estímulo incondicionado (Bouton, Westbrook, Corcoran, & Maren, 2006), comúnmente se requiere de una menor intensidad del estímulo incondicionado para producir una respuesta similar a la obtenida después del aprendizaje.

Las principales estructuras cerebrales implicadas en la extinción de conductas aversivas son el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Quirk & Mueller, 2007). Estudios con lesiones o mediante la administración de distintos fármacos han permitido



proponer que durante la extinción la información del estímulo condicionado es recibida por el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (específicamente la región infralímbica). La corteza prefrontal integra la información percibida acerca del estímulo condicionado así como la información del contexto, provista por el hipocampo, para determinar la ocurrencia de la extinción. Cuando la extinción se establece, la corteza prefrontal inhibe la actividad en la amígdala para así provocar una reducción en la respuesta de miedo (Quirk & Mueller, 2007).

### 7.1.3 Elementos bioquímicos requeridos para la extinción de una conducta

El sistema glutamatérgico participa en la extinción de conductas aversivas, sin embargo existe un papel diferencial entre los tipos de receptores involucrados. Mientras que el bloqueo de los receptores mGlu1 en la amígdala y el bloqueo de los NMDAR tanto en la amígdala como en el hipocampo interfieren con la extinción (Falls, Miserendino, & Davis, 1992; Kim et al., 2007; Lin, Yeh, Lu, & Gean, 2003; Sotres-Bayon, Bush, & LeDoux, 2007; Szapiro, Vianna, McGaugh, Medina, & Izquierdo, 2003), el bloqueo de los receptores AMPA en la amígdala no produce ningún efecto sobre la extinción (Falls et al., 1992; Lin, Yeh, Lu, et al., 2003) (**Tabla I**).

La participación del sistema colinérgico en la extinción ha sido demostrada mediante inyecciones sistémicas de antagonistas o agonistas (Prado-Alcalá et al., 1994; Roldán-Roldán, Cobos-Zapiain, Quirarte, & Prado-Alcalá, 2001; Santini et al., 2012) o en estructuras particulares como la amígdala (Boccia et al., 2009), la corteza infralímbica (Santini et al., 2012) y a través de lesiones del septum medial, el cual es una entrada colinérgica para el hipocampo (Tronson et al., 2009).

El estrés y moléculas liberadas después de la exposición a un evento estresante influyen en la extinción. La exposición al estrés generado por nado forzado días antes del condicionamiento de miedo al tono produce un retraso en la extinción de este condicionamiento sin alterar el aprendizaje de esta tarea (Izquierdo, Wellman, & Holmes, 2006). Además, este estresor induce una retracción de espinas dendríticas en la corteza infralímbica sin ningún cambio en la corteza prelímbica reforzando así una prioritaria participación de la corteza infralímbica en el proceso de extinción y un papel menor de la corteza prelímbica en este proceso (Izquierdo et al., 2006). De manera más específica se

ha demostrado que las hormonas del estrés noradrenalina y glucocorticoides facilitan el proceso de extinción. La administración de noradrenalina en la amígdala acelera la extinción (Berlau & McGaugh, 2006) mientras que el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la corteza infralímbica impide el establecimiento de la extinción (Mueller, Porter, & Quirk, 2008). El uso de agonistas a glucocorticoides administrados de manera sistémica o en la amígdala también facilitan la extinción (Berlau & McGaugh, 2006; Yang, Chao, & Lu, 2005). En conjunto estos resultados podrían parecer contradictorios ya que mientras la exposición a un estresor físico retrasa la extinción, la administración de las moléculas del estrés la promueven. Sin embargo, hay que considerar que el estrés puede modular en ambos sentidos (facilitando o deteriorando) un proceso cognoscitivo, dependiendo del momento en el que se administra el estresor, la duración del estresor y la cantidad de hormonas del estrés (Jöels & Baram, 2009). En este sentido el estrés por nado forzado que fue producido durante periodos breves pero 3 días previos al aprendizaje (Izquierdo et al., 2006), correspondería a un estresor semicrónico y los efectos sobre la conducta serían efectos tardíos en los que se implican los procesos de transcripción de genes, modificaciones en el número de receptores GR y cambios morfológicos (Jöels & Baram, 2009); mientras que la administración de noradrenalina y glucocorticoides (Berlau & McGaugh, 2006; Yang et al., 2005) semejarían a un estrés agudo provocado justo antes del proceso de extinción, el cual activaría receptores membranales y vías de señalización en el citoplasma neuronal (Jöels & Baram, 2009). La consideración de las características y tiempo de administración del estresor es sumamente importante ya que dependiendo de las condiciones en las que ocurre una memoria negativa se puede facilitar o impedir la extinción de una conducta.

La actividad de las enzimas ERK, CAMKII, PKA, PKC y calcineurina es requerida para el establecimiento de la extinción. El bloqueo de ERK en la amígdala retrasa el establecimiento de la extinción (Herry, Trifilieff, Micheau, Lüthi, & Mons, 2006; Lin, Yeh, Lu, et al., 2003); de manera similar el bloqueo de CAMKII en el hipocampo o en la amígdala también impide la extinción (Myskiw et al., 2010; Szapiro et al., 2003). La participación de la PKA depende altamente del momento en que el inhibidor sea administrado. La administración de un inhibidor de la PKA en el hipocampo después de la primera sesión de prueba en la tarea de evitación inhibitoria, que es considerada el inicio

de la extinción, produce inicialmente una aceleración de la extinción observada en la sesión siguiente mientras que en sesiones posteriores se observa una inhibición de este proceso (Szapiro et al., 2003). Por otra parte, en el trabajo de Szapiro et al. (2000) se administró un inhibidor de la PKA antes de la primera sesión de prueba y se encontró que este tratamiento provocó que los animales no recordaran adecuadamente la tarea en esa sesión. En conjunto los trabajos de Szapiro et al. (2003) y de Szapiro et al. (2000) demuestran que la inhibición de la PKA interfiere con la evocación, que esta inhibición puede seguir interfiriendo la salida de la información aún en una sesión posterior de reexposición al contexto de aprendizaje y que además la inhibición de la PKA impide el establecimiento de la extinción. Contrario a lo observado con ERK, CAMKII y PKA, el bloqueo de la actividad de la PKC facilita el establecimiento de la extinción (Tronson et al., 2007). Las enzimas ERK, CAMKII, PKA y PKC llevan a cabo su función agregando grupos fosfato a otras proteínas mientras que proteínas como la calcineurina remueven grupos fosfato de otras proteínas tales como la tubulina, sinapsina I (necesaria para anclar vesículas sinápticas a la membrana neuronal) y de los factores de transcripción CREB y NFAT (Groth, Dunbar, & Mermelstein, 2003). Se ha observado que el bloqueo de la actividad de la calcineurina tanto en el hipocampo como en la amígdala impide la extinción (de la Fuente et al., 2011; Lin, Yeh, Leu, et al., 2003). Así, la extinción implica tanto la fosforilación de proteínas, como la desfosforilación de proteínas, pero aún hay que identificar las moléculas río abajo de la actividad de ERK, CAMKII, PKA, PKC y la calcineurina que influyen en este proceso.

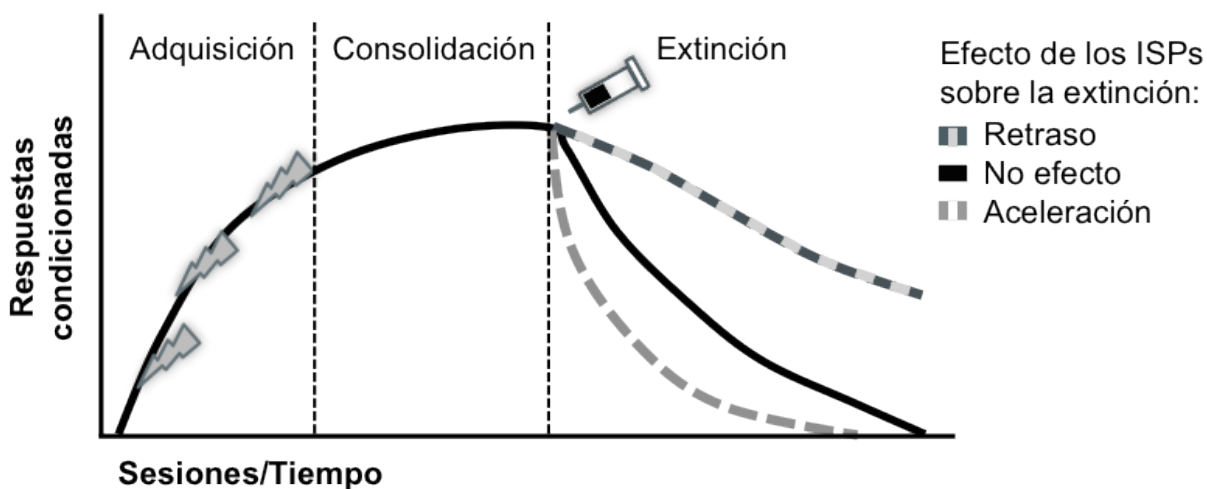
Mediante el uso de inhibidores de la transcripción y de la traducción se ha demostrado que estos eventos celulares son importantes para la extinción de la conducta. Administrando los inhibidores de la transcripción DRB en el hipocampo o actinomicina-D en la corteza infralímbica se ha demostrado que la expresión génica es necesaria para la extinción (Mueller et al., 2008; Vianna et al., 2003). Sin embargo, la administración de actinomicina-D en la amígdala después de una sesión de extinción en el sobresalto potenciado por miedo sugiere que la expresión de genes no es necesaria para la extinción (Lin, Yeh, Lu, et al., 2003). Si bien en los tres trabajos los tratamientos fueron administrados antes de la sesión de extinción, la discrepancia entre los resultados podría estar explicada por el momento en el que se evalúa el establecimiento de la extinción.

Mientras que en los trabajos de Mueller et al. (2008) y de Vianna et al. (2003), el efecto de la inhibición de la transcripción es evaluado 24 h después de la sesión de extinción, en el trabajo de Lin, Yeh, Lu, et al. (2003) los sujetos fueron evaluados 20 min después. Podría ser que, de manera similar a lo que ocurre con la formación de una memoria “nueva”, etapas tempranas de la extinción de una conducta son independientes de la expresión de genes mientras que el establecimiento de la extinción a largo plazo sí depende de ésta.

Por otra parte el efecto de la inhibición de la síntesis de proteínas en la extinción es menos claro ya que varios trabajos han demostrado que los ISP interfieren con la extinción (Berman & Dudai, 2001; Braud & Broussard, 1973; Cammarota, Bevilaqua, Rossato, et al., 2005; Cohen & Gotthard, 2011; Flood, Jarvik, Bennett, Orme, & Rosenzweig, 1977; Gotthard & Knoppel, 2010; Lin, Yeh, Lu, et al., 2003; Mamiya et al., 2009; Mueller et al., 2008; Power et al., 2006; Sandusky, Flint, & McNay, 2012; Santini, Ge, Ren, Peña de Ortiz, & Quirk, 2004; Vianna et al., 2003), mientras que otros reportan que facilitan la extinción (Fischer, Sananbenesi, Schrick, Spiess, & Radulovic, 2004; Power et al., 2006) o que no tienen efecto en este tipo de aprendizaje (Lattal & Abel, 2001; Lattal, Honarvar, & Abel, 2004) (Figura 22).

Se ha propuesto que los inhibidores de la síntesis de proteínas facilitan la extinción cuando la intensidad de la memoria original es fuerte, mientras que si la memoria es débil la extinción se impide. La administración de anisomicina en la corteza insular después de la primera sesión de extinción en animales que fueron entrenados por una sesión retrasa la extinción de una conducta de aversión (Eisenberg et al., 2003). Por el contrario, la administración de anisomicina en animales que fueron entrenados por dos sesiones provocó una disminución de la respuesta condicionada; en ambos grupos se mantuvo fijo el número de sesiones de prueba. Eisenberg et al. (2003) proponen que los efectos opuestos de la anisomicina se deben a que en los animales que fueron entrenados por una sesión la memoria que predomina durante la sesión de prueba es la de la extinción, mientras que en animales entrenados durante dos sesiones la memoria original es la que predomina en la sesión de prueba. Estos resultados son consistentes con experimentos donde el efecto de los ISPs se ha evaluado variando el tiempo de reexposición al contexto o variando el número de sesiones de extinción. Se ha encontrado que los inhibidores de síntesis de proteínas provocan una disminución en la respuesta condicionada cuando el

tiempo de reexposición al contexto donde se aprendió es breve o cuando el número de reexposiciones también es breve, mientras que los ISPs provocan un mayor número de respuestas condicionadas si los sujetos fueron reexpuestos al contexto por periodos prolongados o por múltiples sesiones (Mamiya et al., 2009; Sandusky et al., 2012; Suzuki et al., 2004). Sin embargo es difícil identificar claramente si el diferente número de sesiones de entrenamiento, de sesiones de extinción o la duración de éstas es lo que explica los efectos diferenciales de los ISPs en la extinción.



**Figura 22.** Representación de las etapas de la memoria y del proceso de extinción y de los efectos de los inhibidores de síntesis de proteínas (ISPs) sobre este proceso. Durante la adquisición se asocia un contexto con una consecuencia, en este caso aversiva. La consolidación es un periodo de estabilización durante el cual los animales comúnmente permanecen en su caja habitación. La administración de distintos ISPs antes de la sesión de extinción puede provocar tres resultados: retraso, no efecto o aceleración de la extinción (e. g. Cammarota, Bevilaqua, Rossato, et al., 2005; Fischer et al., 2004; Lattal & Abel, 2001).

Los trabajos de Galindo et al. (2008) y Garín-Aguilar et al. (2012) en la tarea de evitación activa y evitación inhibitoria respectivamente, demuestran que también se pueden formar memorias con distinta fortaleza variando la intensidad de estímulo aversivo empleado durante el entrenamiento. Esta fortaleza se observa mediante una mayor resistencia a la extinción en animales que fueron entrenados con una intensidad de choque alta; bajo estas condiciones los animales requieren de un amplio número de sesiones de extinción para mostrar una reducción en el número de respuestas

condicionadas mientras que animales entrenados con un choque bajo muestran signos de extinción con pocas sesiones de reexposición al contexto de entrenamiento.

Asimismo parece que la ventana temporal en que la transcripción y la traducción son requeridas durante la extinción es menor que la de la consolidación. Mientras que durante la consolidación el tratamiento con inhibidores de la transcripción o de la síntesis de proteínas interfiere con la conducta cuando son administrados 15 min antes o 3 hr después del entrenamiento (Igaz, Vianna, Medina, & Izquierdo, 2002), se interfiere con la extinción sólo si estos tratamientos se administran 15 min antes de la primera sesión de extinción (Vianna et al., 2003). Esto sugiere que durante la extinción, existe un periodo de tiempo menor que el de la consolidación para renovar esa información derivada de la nueva experiencia debido a que los cambios neuronales estarían ocurriendo por poco tiempo.

#### 7.1.4 Reconsolidación y actualización de la información

Se propone que debido a la evocación los contenidos de una memoria consolidada pueden ser cambiados e incluso eliminados por un proceso denominado reconsolidación (Nader & Einarsson, 2010). El trabajo de Nader et al. (2000) en el que la inhibición de la síntesis de proteínas en la amígdala tras la reactivación de una memoria formada en el condicionamiento de miedo al tono provoca la eliminación de esta memoria, reavivó el interés por estudios realizados décadas antes en los que distintos tratamientos aplicados después de la evocación afectaban memorias consolidadas (Gordon, 1977; Misanin, Miller, & Lewis, 1968; Schneider & Sherman, 1968). Los trabajos acerca de la reconsolidación han propuesto que la memoria de largo plazo no es el final en términos de labilidad sino una pausa hasta que esta memoria es reactivada (Nader & Einarsson, 2010). Las grandes controversias sobre la generalidad de la reconsolidación se han basado en que parecen existir condiciones particulares para observar este fenómeno, tales como la edad de la memoria, tiempo de reactivación de la memoria e intensidad del entrenamiento (Suzuki et al., 2004).

Es importante recordar que la reconsolidación y la extinción están íntimamente ligadas, ya que la evocación puede dar pie a una o a otra. Diversos grupos de investigación se han interesado en encontrar no sólo las condiciones conductuales, sino

también las moleculares que guían a una memoria a tomar el camino de la reconsolidación o la extinción. Una reexposición breve o por pocas sesiones al contexto donde se aprendió, ya sin ninguna consecuencia, da pie a la reconsolidación en la mayoría de los casos (para excepciones revisar Power et al., 2006) mientras que si esta exposición es prolongada o por varias sesiones se observa el proceso de extinción (Merlo et al., 2014; Suzuki et al., 2004). Sin embargo, también se ha reportado que existe una etapa de “limbo” en la que la reexposición intermedia no da pie a uno ni a otro proceso (Merlo et al., 2014).

Finalmente hablaremos de la actualización de la información, que si bien ya hace una década que se ha prestado interés relativamente continuo a este fenómeno, aún no se cuenta con un escenario claro de las condiciones conductuales que la producen ni de los elementos moleculares que la inducen. La propuesta de la actualización de la información establece que una vez que se ha formado una memoria ésta puede ser modificada solamente cuando las condiciones del contexto al momento de la evocación varían significativamente con respecto a las condiciones en las que se dio el aprendizaje, o cuando hay nueva información que puede ser relevante para que sea integrada a la memoria inicial (Choi, Kim, & Kaang, 2010; Morris et al., 2006; Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Rossato et al., 2007). Esta misma idea ha sido denominada “error de predicción” donde se propone que cuando las condiciones al momento de evocar son muy parecidas a las del aprendizaje original (e.g. choque eléctrico durante el entrenamiento y durante la prueba) entonces los sujetos pueden hacer predicciones precisas acerca de las consecuencias de su conducta mientras que cuando las condiciones al momento de evocar difieren ampliamente de las condiciones de aprendizaje (e. g. choque eléctrico durante el entrenamiento y ausencia del choque durante la prueba) entonces los sujetos tienen incertidumbre sobre lo que va a ocurrir; sólo bajo esta segunda condición es cuando se inducen eventos neuronales plásticos tales como la síntesis de proteínas que permiten la modificación de la memoria preexistente (Sevenster, Beckers, & Kindt, 2013).

## **7.2 Justificación**

El campo de la memoria se ha enfocado principalmente a entender cómo se consolida una memoria. Sin embargo, una memoria consolidada no es estática, a través de la evocación podemos traerla al presente y modificarla. Durante la evocación se induce el proceso extinción, que permite modificar la conducta aprendida. En diversos estudios se ha encontrado que los inhibidores de la síntesis de proteínas impiden la extinción; sin embargo, hay algunos autores que reportan que estos mismos tratamientos la facilitan o no tienen efecto. Se sugiere que los efectos de los inhibidores de síntesis de proteínas sobre la extinción dependen de distintas variables como tiempo de reexposición al contexto donde se aprendió y del número de sesiones de entrenamiento o de prueba. Sin embargo aún no es claro cuál de estas variables explica los efectos sobre la extinción. Además ningún trabajo ha variado la intensidad del estímulo aversivo empleada durante el entrenamiento para evaluar su efecto sobre la inhibición de síntesis de proteínas y la extinción.

## **7.3 Hipótesis**

- La administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas retrasará el proceso de extinción en la tarea de evitación activa en animales entrenados con una intensidad baja de choque eléctrico.
- La administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas acelerará el proceso de extinción en la tarea de evitación activa en animales entrenados con una intensidad alta de choque eléctrico.

## **7.4 Objetivo**

Evaluar el papel de la síntesis de proteínas en la extinción de la tarea de evitación activa empleando un choque bajo o alto durante el entrenamiento.



## 7.5 Método

### 7.5.1 Tarea de evitación activa

En cada uno de los 20 ensayos la rata se introdujo en el compartimento oscuro (de choque) e inmediatamente después se abrió la puerta de guillotina. Se calificó como acierto si la rata cruzaba al compartimento iluminado (de seguridad) en menos de 10 s, y la puerta se cerraba; si la rata no cruzaba al compartimento de seguridad en menos de 10 s, se activaba el estimulador y se mantenía encendido hasta que el animal escapara al compartimento iluminado y entonces se cerraba la puerta, esto último se consideró como un error. La rata permanecía en este compartimento durante 30 s, y se iniciaba un nuevo ensayo regresándola al compartimento oscuro. En la siguiente sección se especificarán las intensidades de choque eléctrico utilizadas.

### 7.5.2 Protocolo de extinción

Las sesiones de extinción se iniciaron 48 h después del entrenamiento de evitación activa y cada una de ellas constó de 20 ensayos idénticos a los de la sesión de entrenamiento, excepto que no se aplicó el choque eléctrico. Se dieron tres o cuatro sesiones, con un intervalo de 48 h entre cada una.

### 7.5.3 Grupos experimentales

Primero se estudiaron dos grupos de ratas, que fueron entrenadas con 2.0 ó 4.0 mA, respectivamente. La mitad de los animales fue tratada con cicloheximida (CXM) y la otra mitad con vehículo (VEH) antes de la primera sesión de extinción. Estos grupos fueron expuestos a 3 sesiones de extinción.

Después se estudiaron otros dos grupos de ratas entrenadas con 2.0 ó 4.0 mA a las que se midió la extinción durante 4 sesiones. La mitad de los animales de cada grupo fue tratada con cicloheximida (CXM) y la otra mitad con vehículo (VEH). La mitad de estos subgrupos recibió la CXM o el VEH antes de la tercera sesión y la otra mitad antes de la cuarta sesión.

#### 7.5.4 Tratamientos farmacológicos

La CXM se utilizó en una dosis de 2.8 mg/kg disuelta en el VEH, el cual consistió en DMSO al 1% en solución salina. La administración se realizó de manera subcutánea 30 min antes de la sesión de extinción correspondiente. Esta dosis de CXM y el tiempo de administración se eligió ya que con ellos se induce amnesia y se logra el nivel máximo de inhibición de síntesis de proteínas cerebral en ratas (Díaz-Trujillo et al., 2009; González-Salinas, 2009; Milekic, Brown, Castellini, & Alberini, 2006; Squire, Davis, Spanis, Gold, & Sternberg, 1980)

#### 7.5.5 Análisis estadístico

La comparación del número de aciertos y latencias de cruce se realizó mediante un ANOVA de tres vías (tratamiento, intensidad y sesión) con medidas repetidas en el factor sesión, seguida de una prueba *post-hoc* Fisher LSD.

### 7.6 Resultados

#### 7.6.1 Administración de la CXM antes de la primera sesión de extinción

La administración de CXM tuvo un efecto sostenido en la conducta de los sujetos que fueron entrenados con la intensidad baja mientras que en sujetos entrenados con la intensidad alta se observó un cambio transitorio. Al analizar el número de aciertos, el ANOVA mostró que el factor intensidad de choque empleado durante el entrenamiento no fue significativo ( $F_{(1, 132)} = 3.03$ ,  $p = 0.09$ ) mientras que los factores tratamiento farmacológico y sesiones sí lo fueron (tratamiento:  $F_{(1,132)} = 7.21$ ,  $p = 0.01$ ; sesiones:  $F_{(3,132)} = 26.29$ ,  $p = 0.0001$ ). La única interacción significativa fue entre tratamientos y sesiones indicando que el tratamiento afectó el establecimiento de la extinción ( $F_{(3, 132)} = 3.45$ ,  $p = 0.02$ ).

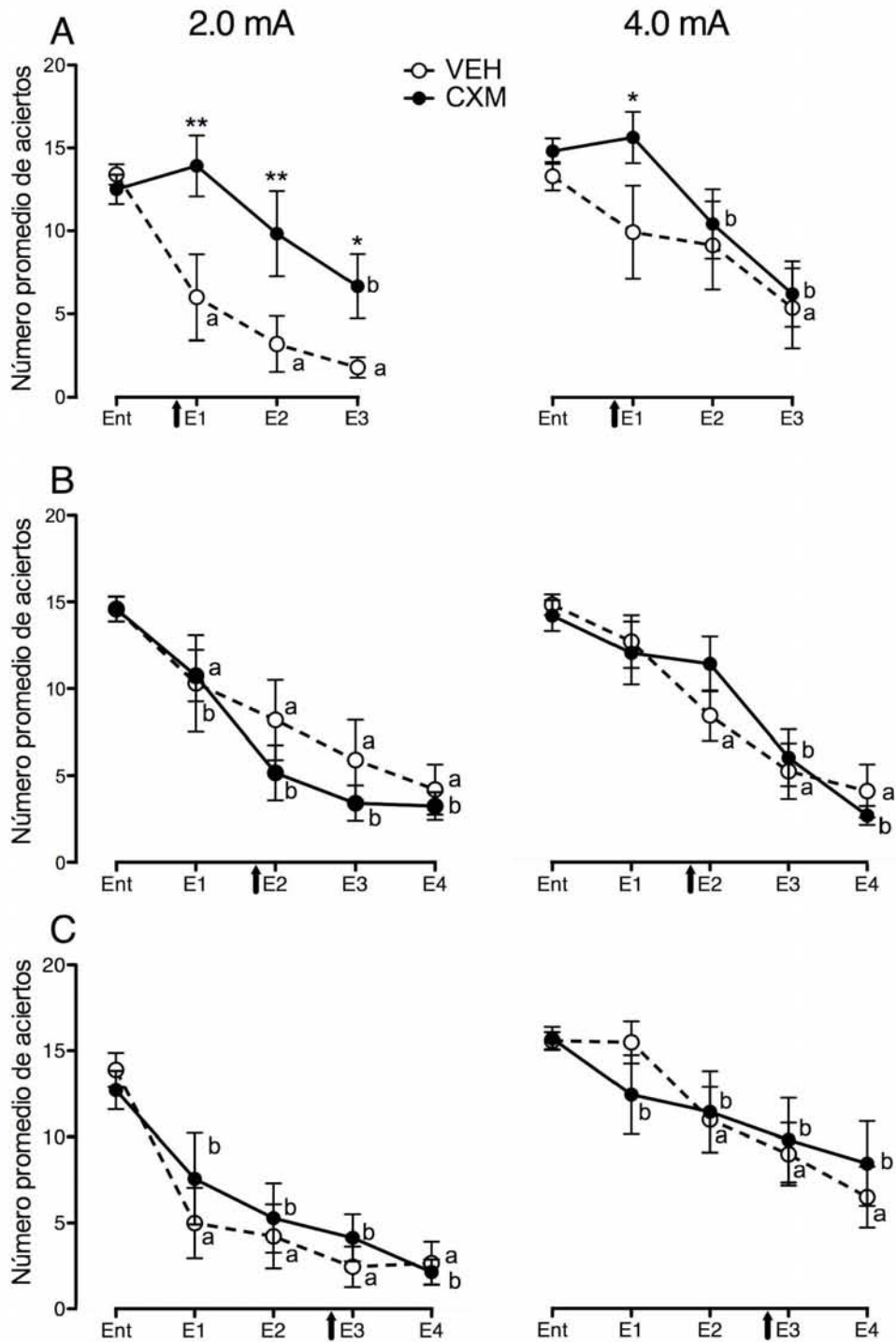
Para facilitar la presentación de los siguientes resultados estadísticos emplearemos las siguientes abreviaturas: Ent, sesión de entrenamiento; E1, E2, E3, E4, sesiones 1, 2 ,3 y 4 de extinción; estas son las abreviaturas que también se presentan en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

El análisis *post-hoc* mostró que los sujetos que fueron entrenados con la intensidad baja y que recibieron CXM antes de la primera sesión de extinción mostraron un mayor

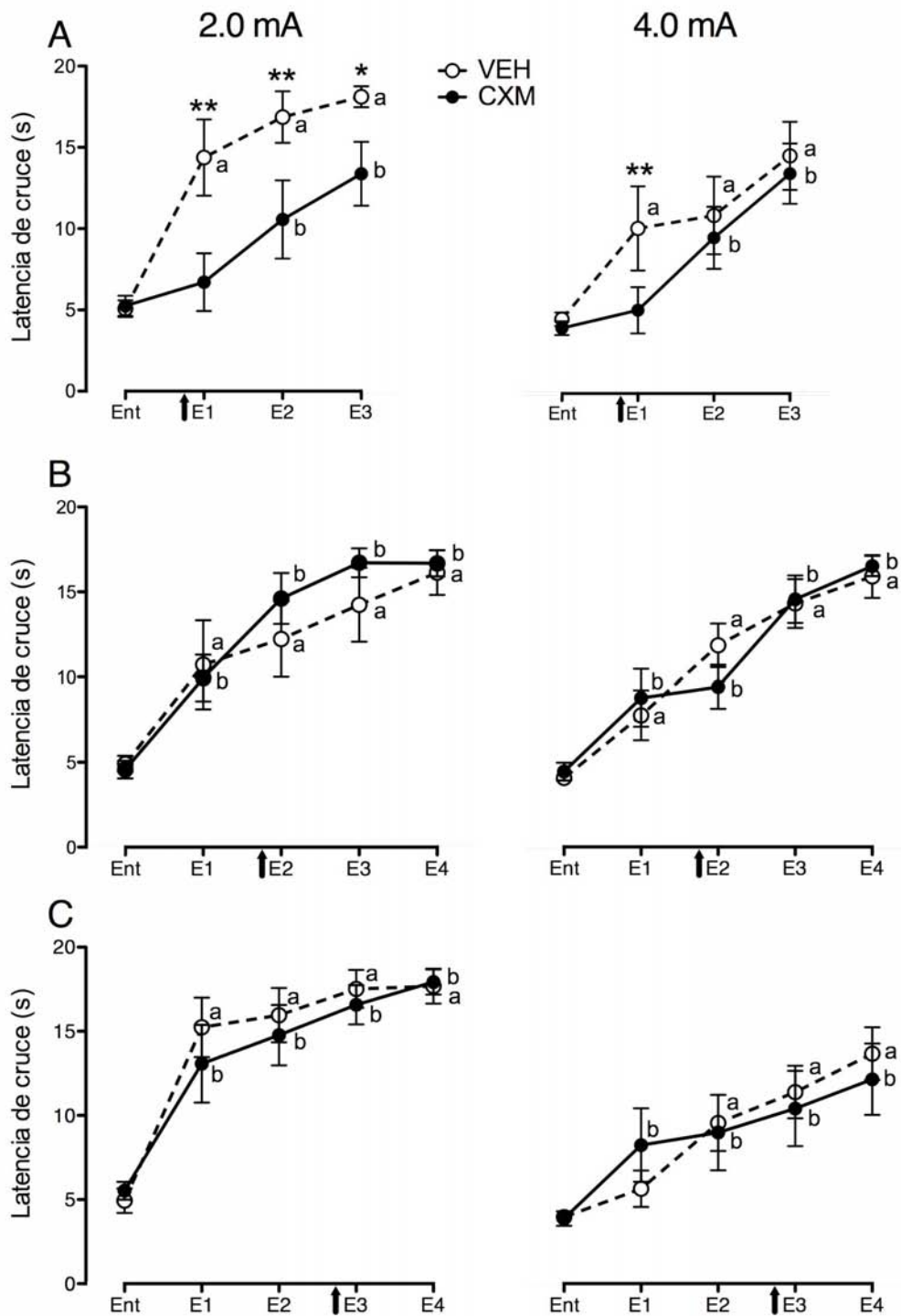
número de aciertos en las tres sesiones de extinción con respecto a su grupo VEH (E1  $p < 0.01$ , E2  $p < 0.01$ , E3  $p < 0.05$ ). Cuando la intensidad alta fue empleada se observó que los animales que recibieron CXM mostraron un mayor número de aciertos sólo en la primera sesión de extinción ( $p < 0.05$ ) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A**).

Observamos que la CXM afectó el establecimiento de la extinción. Mientras que animales VEH entrenados con la intensidad baja mostraron un decremento en el número de aciertos en las tres sesiones de extinción ( $p < 0.05$  E1, E2 y E3 vs Ent), los animales entrenados con la misma intensidad de choque pero que recibieron CXM mostraron signos de extinción hasta la tercera sesión ( $p < 0.05$  en E3 vs Ent). Por otra parte, los animales entrenados con la intensidad alta de choque y que recibieron VEH o CXM mostraron un decremento en el número de aciertos hasta la tercera o segunda sesión de extinción respectivamente (VEH:  $p < 0.05$  en E3 vs Ent; CXM:  $p < 0.05$  en E2 y E3 vs Ent) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A**).

Al analizar las latencias de cruce encontramos resultados similares a los encontrados con el número de aciertos; recordemos que en este caso latencias menores son reflejo de una mejor memoria. Los factores tratamiento y sesiones fueron significativos mientras que la intensidad de entrenamiento no lo fue (tratamiento:  $F_{(1, 132)} = 6.99$ ,  $p = 0.01$ ; sesiones:  $F_{(3, 132)} = 47.08$ ,  $p < 0.0001$ ; intensidad:  $F_{(1, 132)} = 2.25$ ,  $p = 0.1412$ ). Se observó una interacción significativa entre tratamiento y sesiones ( $F_{(3, 132)} = 4.01$ ,  $p = 0.009$ ) indicando que el tratamiento farmacológico provocó un cambio en el tiempo que tomaron los sujetos en cruzar al compartimento iluminado a lo largo de las sesiones. Al realizar las comparaciones *post-hoc* encontramos que los animales entrenados con la intensidad baja y que recibieron CXM mostraron latencias de cruce menores en todas las sesiones de extinción al comparar contra su respectivo grupo VEH (E1  $p < 0.01$ , E2  $p < 0.01$ , E3  $p < 0.05$ ). Cuando la intensidad alta fue empleada durante el entrenamiento solo se encontraron diferencias significativas entre VEH y CXM en la primera sesión de extinción ( $p < 0.01$ ) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A**).



**Figura 23.** Aciertos en la tarea de evitación activa. Se muestra el promedio de aciertos  $\pm$  error estándar de la media en la sesión de entrenamiento (Ent) y en las sesiones de extinción (E1, E2, E3 y E4). La flecha indica que el tratamiento farmacológico fue administrado 30 min antes de la sesión de extinción señalada. \*  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$  VEH vs CXM; a,  $p < 0.05$  vs Ent en VEH; b,  $p < 0.05$  vs Ent en CXM;  $n = 7-13$ .



**Figura 24.** Latencias de cruce en la tarea de evitación activa. Se muestra el tiempo promedio  $\pm$  error estándar de la media que tomaron los sujetos en cruzar del compartimento oscuro al iluminado en las sesiones de entrenamiento (Ent) o de extinción (E1, E2, E3 y E4). La flecha indica que el tratamiento farmacológico fue administrado 30 min antes de la sesión de extinción señalada. \*  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$  VEH vs CXM; a,  $p < 0.05$  vs Ent en VEH; b,  $p < 0.05$  vs Ent en CXM;  $n = 7-13$ .

Con respecto al establecimiento de la extinción encontramos que el tratamiento con CXM causó que los animales entrenados con la intensidad baja o alta requirieran una sesión más de extinción que el grupo VEH. Los animales VEH entrenados con cualquiera de las dos intensidades mostraron un aumento significativo en las latencias de cruce con respecto al día del entrenamiento a partir de la primera sesión de extinción ( $p < 0.05$  para cada comparación) mientras que los que recibieron como tratamiento la CXM mostraron un aumento de las latencias de cruce a partir de la segunda sesión de extinción ( $p < 0.01$  en E2 y E3 vs Ent).

En el experimento anterior el análisis del número de aciertos sugirió que el establecimiento de la extinción en animales que fueron entrenados con la intensidad alta requiere de más sesiones de extinción. Podría ser que la CXM no afectó profundamente la extinción en animales entrenados con la intensidad alta porque el proceso de extinción no se inicia en la primera sesión sino hasta la segunda o tercera sesión. Se ha reportado que el tratamiento con un inhibidor de ERK afecta el establecimiento de la extinción sólo cuando éste es administrado antes de una segunda sesión de extinción mientras que ningún efecto es observado si el tratamiento se administra antes de la primera sesión (Herry et al., 2006); este trabajo sugiere que la extinción puede ser interferida después de una segunda reexposición al contexto donde se aprendió.

Para observar mejor el proceso de extinción consideramos importante aumentar el número de sesiones de extinción para los siguientes experimentos, por ello los animales que recibieron el tratamiento antes de la segunda o tercera sesión de extinción fueron sometidos a un total de cuatros sesiones de extinción.

#### 7.6.2 Administración de la CXM antes de la segunda sesión de extinción

Con respecto al número de aciertos, no hubo diferencias significativas en los factores intensidad ni tratamiento (intensidad:  $F_{(1, 184)} = 1.37$ ,  $p = 0.249$ ; tratamiento:  $F_{(1, 184)} = 0.22$ ,  $p = 0.64$ ), sólo se encontró un efecto de las sesiones ( $F_{(4, 184)} = 76.10$ ,  $p = 0.0001$ ). Ninguna de las interacciones entre los factores fue significativa. Los sujetos entrenados con la intensidad baja que recibieron VEH o CXM mostraron un menor número de

respuestas de evitación en cada sesión de extinción con respecto al día del entrenamiento ( $p < 0.05$  para cada comparación). En los animales entrenados con la intensidad alta que recibieron VEH se observó una disminución significativa en el número de aciertos a partir de la segunda sesión de extinción ( $p < 0.05$  en E2, E3 y E4 vs Ent) mientras que en animales que recibieron CXM este cambio se observó a partir de la tercera sesión ( $p < 0.05$  en E3 y E4 vs Ent) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.B**). Al analizar las atenciones de cruce encontramos que sólo el factor sesión fue significativo ( $F_{(4, 184)} = 108.98$ ,  $p < 0.0001$ ) y ninguna otro factor o interacción entre ellos mostró significancia estadística. El análisis *post-hoc* mostró que las latencias de cruce aumentaron a partir de la primera sesión de extinción con respecto al día del entrenamiento tanto en animales que recibieron VEH como CXM y que fueron entrenados con la intensidad baja o alta ( $p < 0.05$  para cada comparación), es decir, todos los grupos mostraron signos de extinción a partir de la primera sesión (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.B**).

### 7.6.3 Administración de la CXM antes de la tercera sesión de extinción

El análisis de varianza mostró un efecto significativo en los factores intensidad y sesiones (intensidad:  $F_{(1, 148)} = 19.79$ ,  $p < 0.0001$ ; sesiones:  $F_{(4, 148)} = 53.97$ ,  $p = 0.0001$ ) mientras que el tratamiento no fue significativo ( $F_{(1, 148)} = 0.10$ ,  $p = 0.75$ ). La interacción entre intensidad y sesión fue significativa ( $F_{(4, 148)} = 3.92$ ,  $p = 0.005$ ) mostrando así que el número de aciertos que emiten los animales depende tanto de la intensidad con la que fueron entrenados los sujetos como de la sesión en la que se estén evaluando. En animales entrenados con la intensidad baja observamos que el número de aciertos disminuyó a partir de la primera sesión de extinción independientemente del tratamiento farmacológico ( $p < 0.05$  en E1, E2, E3 y E4 vs Ent tanto en VEH como en CXM). Por otra parte, cuando el entrenamiento que recibieron los sujetos fue alto, el número de aciertos comienza a disminuir a partir de la segunda sesión de extinción en animales VEH y desde la primera sesión en animales CXM (VEH:  $p < 0.05$  en E2, E3 y E4 vs Ent; CXM:  $p < 0.05$  en E1, E2, E3 y E4 vs Ent) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.C**). El análisis e las latencias de cruce mostró que los factores intensidad y sesión fueron significativos (intensidad:  $F_{(1, 148)} = 17.45$ ,  $p < 0.0002$ ; sesión:  $F_{(4, 148)} = 78.11$ ,  $p < 0.0001$ ) mientras que el factor tratamiento no tuvo significancia estadística ( $F_{(1, 148)} = 0.10$ ,  $p = 0.745$ ). La única

interacción significativa fue aquella entre intensidad y sesión ( $F_{(4, 148)} = 5.76, p=0.0003$ ). Cuando la intensidad baja fue empleada durante el entrenamiento se encontró que las latencias de cruce aumentaron tanto en el grupo VEH como CXM a partir de la primera sesión de extinción ( $p<0.05$  en E1, E2, E3 y E4 vs Ent tanto para VEH como para CXM). Los animales que fueron entrenados con la intensidad alta y que recibieron VEH mostraron un aumento en las latencias de cruce a partir de la segunda sesión de extinción mientras que los que recibieron CXM mostraron un aumento desde la primera sesión (VEH:  $p<0.05$  en E2, E3 y E4 vs Ent; CXM:  $p<0.05$  en E1, E2, E3 y E4 vs Ent) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**C**).

El análisis tanto del número de aciertos como de las latencias de cruce demostró que el inhibidor de síntesis de proteínas CXM provoca un retraso en la extinción sólo cuando es administrado antes de la primera sesión de extinción y cuando los animales son entrenados con una intensidad baja. Cuando el entrenamiento fue con una intensidad alta se observó un efecto transitorio de la CXM que no afectó el establecimiento de la extinción. No se observó ningún efecto cuando las administraciones fueron realizadas antes de la segunda o tercera sesión de extinción. Estos resultados mostraron que el efecto de la CXM depende de la intensidad del entrenamiento y del momento de administración, siendo la primera sesión de extinción en la que ocurren cambios dependientes de la síntesis de proteínas para que se establezca este proceso.

## 7.7 Discusión

Encontramos que la CXM tuvo efectos diferenciales en la extinción, dependiendo del momento de su administración así como de la intensidad empleada durante el entrenamiento. Cuando la CXM se administró antes de la primera sesión de extinción, retrasó el establecimiento de la extinción cuando se empleó el choque bajo durante el entrenamiento (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A** y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**A**). Es poco probable que este retraso se debiera a algún tipo de interferencia con la ejecución de la tarea, ya que si fuera el caso entonces se hubiera observado un incremento en el número de aciertos o una disminución en las latencias en todos los grupos a los que se administró la CXM, independientemente del momento de la inyección o de la intensidad de entrenamiento, pero no se observó ningún



efecto cuando la CXM se administró antes de la segunda o tercera sesión de extinción (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B, C** y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B,C**).

El hallazgo de que una sola administración del inhibidor de síntesis de proteínas, justo antes del inicio de la extinción interfiere con el establecimiento de la extinción en el grupo entrenado con la intensidad baja es consistente con el trabajo de Cammarota, Bevilaqua, Rossato, et al. (2005). Ellos encontraron que una sola administración del inhibidor de síntesis de proteínas anisomicina en el hipocampo antes de la primera de una serie de sesiones de extinción indujo un efecto sostenido sobre la extinción en la tarea de evitación inhibitoria. Estos resultados resaltan la importancia del procesamiento asociativo intacto que debe suceder durante la exposición inicial a la experiencia de la extinción, para que este nuevo aprendizaje pueda ocurrir. También encontramos que cuando los animales entrenados con la intensidad baja fueron inyectados con CXM antes de la segunda o tercera sesión de extinción, la extinción ocurrió de manera normal, como lo demuestra la ausencia de efectos conductuales de la CXM en estos grupos (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B, C** y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B,C**). Este fenómeno había sido reportado previamente por Cammarota, Bevilaqua, Rossato, et al. (2005); la administración de anisomicina en el hipocampo 15 min antes de la tercera sesión de extinción no interfirió con el proceso de extinción en las sesiones subsecuentes. Estos datos indican que una vez que se experimenta una sesión no reforzada, como sucede con las sesiones previas a la administración de los tratamientos, la extinción ocurre a pesar de la interferencia con la síntesis de proteínas o con cualquier otra actividad que haya sido alterada por los inhibidores de síntesis de proteínas.

En desacuerdo con nuestros resultados están los publicados por Berman y Dudai (2001) quienes encontraron que una sola administración de un inhibidor de síntesis de proteínas antes de la primera de tres sesiones no reforzadas produjo un impedimento transitorio sobre la extinción, el cual fue evidente sólo en la segunda sesión; en la tercera sesión, la extinción se estableció de manera normal. Además de las obvias diferencias en las vías de administración de los inhibidores de síntesis de proteínas en los estudios de Berman y Dudai (2001), Cammarota, Bevilaqua, Rossato, et al. (2005) y el de la presente tesis (infusión en la corteza insular, en el hipocampo y administración sistémica,

respectivamente), se deben considerar las diferencias en el entrenamiento. Mientras que Berman y Dudai (2001) emplearon un condicionamiento de aversión a los sabores, que se basa en un condicionamiento clásico, en los otros dos trabajos se empleó un modelo de condicionamiento de dos factores; la evitación inhibitoria y la evitación activa implican una asociación del contexto (estímulo condicionado) con un choque eléctrico (estímulo incondicionado) y un aprendizaje instrumental reforzado negativamente (el escapar antes de 10 seg permite que se evite el choque). Estas diferencias en el procedimiento de entrenamiento probablemente son las responsables de los efectos diferenciales de los inhibidores de síntesis de proteínas en el desarrollo de la extinción.

El hallazgo de que la administración de la CXM justo antes del inicio de la extinción interfirió con este proceso, en animales entrenados con una intensidad baja de choque sugeriría que la síntesis de proteínas *de novo* es indispensable para que se produzca la extinción como han mostrado diversos trabajos (Berman & Dudai, 2001; Cammarota, Bevilaqua, Rossato, et al., 2005; Flood et al., 1977; Santini et al., 2004; Vianna, Szapiro, McGaugh, Medina, & Izquierdo, 2001). Sin embargo esta interpretación debe ser tomada con reserva, porque también debió haber sido observada una interferencia con la extinción en animales entrenados con la intensidad alta y éste no fue el caso. La CXM interfirió con la extinción transitoriamente cuando fue administrada antes de la primera sesión en animales entrenados con la intensidad alta pero en las sesiones subsecuentes la extinción ocurrió de manera normal (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.A y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.A). Además, la extinción no fue afectada en el resto de los grupos que recibieron CXM independientemente de la intensidad de choque o del momento de la administración del fármaco (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.B, C y ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.B, C).

Nuestro hallazgo de que la CXM tuvo sólo un efecto transitorio sobre la extinción de la tarea de evitación activa en animales entrenados con una intensidad alta de choque, concuerda con los resultados observados en la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria, que demostraron que la CXM no interfirió con la consolidación cuando durante el entrenamiento se empleó una intensidad alta de choque (Díaz-Trujillo et al., 2009). También concuerda con el hallazgo de que los inhibidores de síntesis de proteínas no tienen efectos consistentes en la consolidación; recientemente se reportó que una dosis

alta de CXM fue inefectiva cuando el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria fue mediado por intensidades bajas de choque, sin embargo, se interfirió con la consolidación cuando se emplearon intensidades altas de choque, y además se observó que una dosis baja de CXM también mejora la consolidación (Gold & Wrenn, 2012).

Se han propuesto varios mecanismos alternativos a la síntesis de proteínas para explicar la formación de la memoria. Algunos ejemplos incluyen las modificaciones post-traduccionales de proteínas preexistentes en la sinapsis (Routtenberg & Rekart, 2005) y los referidos por Lattal y Abel (2001) como son las alteraciones en el citoesqueleto neuronal (Kennedy, 1997; van Rossum & Hanisch, 1999), la autofosforilación de cinasas (Lisman, 1985) y la proteólisis (Lynch & Baudry, 1984).

A pesar de que aún estamos lejos de entender los mecanismos que subyacen a la ausencia de efecto de distintos tipos de agentes amnésicos cuando los animales son entrenados con intensidades altas (Prado-Alcalá, Medina, Serafin, & Quirarte, 2012), una creciente literatura apoya la idea de que los agentes amnésicos ejecen su efecto cuando la información novedosa se está actualizando (Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Rodriguez-Ortiz, Garcia-DeLaTorre, Benavidez, Ballesteros, & Bermudez-Rattoni, 2008; Rossato et al., 2007); así los ensayos iniciales de extinción sirven como una pieza nueva de información para un organismo que ha recibido de manera consistente un reforzador. Bajo esta perspectiva, la administración de CXM antes de la primera serie de sesiones de extinción en este estudio produjo un efecto amnésico cuando la intensidad baja fue empleada durante el entrenamiento debido a que la memoria del choque previo estaba siendo actualizada hacia una memoria de extinción. La ausencia de efecto cuando la CXM fue administrada antes de la segunda o tercera sesión de extinción fue debida a la ausencia de información nueva durante estas sesiones (i. e. las ratas ya habían tenido algún tipo de extinción). Sin embargo, es difícil interpretar bajo la teoría de la actualización el efecto transitorio de la CXM en animales entrenados con la intensidad alta. En teoría, estos animales también estaban experimentando actualización de la información y uno esperaría que la CXM hubiera interferido este aprendizaje pero no ocurrió así.

Sin embargo, si las condiciones del contexto donde ocurrió la extinción difirieran más de las condiciones del aprendizaje (e.g. modificando la intensidad de la luz, agregando un olor al contexto o cambiando la textura del piso de la cámara) o la duración

de las sesiones de extinción fuera más prolongada, podrían entonces ocurrir eventos plásticos que permitieran que la CXM interfiriera con la extinción aún en esos animales entrenados con la intensidad alta. Esta propuesta se basa en que se ha observado que memorias más robustas requieren de que las condiciones del contexto se modifiquen o que la sesión de evocación se prolongue para que sean sensibles a agentes amnésicos (Suzuki et al., 2004; Winters et al., 2009).

Con base en el análisis del número de aciertos observados en las distintas sesiones a las que fueron expuestos los animales podemos sugerir que la memoria generada con la intensidad baja de choque fue más débil que la memoria generada con la intensidad alta ya que los animales requirieron distinto número de sesiones de extinción para mostrar una disminución en la conducta (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.). Nuestros resultados indican que el entrenamiento en la tarea de evitación activa empleando una intensidad baja genera una memoria débil, y que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas retrasa el establecimiento de la extinción en estas condiciones. Por otra parte el entrenamiento en esta misma tarea ahora empleando una intensidad más alta, genera una memoria robusta, bajo estas condiciones no se interfiere sustancialmente con el proceso de extinción cuando se aplica un inhibidor de la síntesis de proteínas.

## 8 DISCUSIÓN GENERAL

La evocación de la memoria no sólo trae al presente las asociaciones formadas durante el aprendizaje sino que abre las puertas de la plasticidad neuronal que permite mantener o modificar una memoria. El presente trabajo apoya la visión de que para modificar una conducta aprendida, ya sea a través de la extinción o de la reconsolidación, se requiere activar la memoria mediante la evocación (Power et al., 2006; Tronson et al., 2006). Se ha determinado que la evocación induce la expresión de genes y la síntesis de proteínas que son relevantes para el establecimiento de los procesos anteriormente mencionados. Como se había demostrado previamente para el condicionamiento de miedo al tono y al contexto (Hall et al., 2001a), nuestros resultados sugieren que en la evitación inhibitoria la evocación induce cambios en la expresión génica de *zif268* en la amígdala. Uno de los hallazgos más importantes de la presente tesis es que la expresión génica en el estriado dorsal se induce claramente por la evocación en la tarea de evitación inhibitoria; trabajos previos habían evaluado la expresión génica en la porción ventral del estriado encontrando que la expresión génica en el zona central del núcleo accumbens se asociaba con la evocación (Thomas et al., 2002). Los grupos control empleados nos mostraron que el componente motor con el que también se ha relacionado al estriado dorsal no es el que induce la expresión de genes sino efectivamente el proceso cognoscitivo. Por otra parte, los cambios observados en el hipocampo nos mostraron que, por lo menos para la evitación inhibitoria, la expresión génica en esta estructura se induce por la reexposición a un contexto y no por la asociación previamente realizada de ese contexto y de una consecuencia aversiva, como lo reportado para el laberinto acuático de Morris y el condicionamiento de miedo al contexto (VanElzakker et al., 2011; von Herten & Giese, 2005). Parece ser que para la evitación inhibitoria, la evocación de la memoria formada en este paradigma induce una actividad neuronal importante en el estriado y la amígdala mientras que la actividad en el hipocampo no es relevante para recuperar la asociación entre un contexto y una consecuencia; los cambios observados nos permiten sugerir que en la evitación inhibitoria el componente instrumental tiene un papel importante y que el componente contextual pasa a segundo plano.

Los resultados obtenidos en los experimentos de expresión génica nos muestran que la expresión de *arc* se induce de manera rápida ya que puede observarse a los 30 min y que su regulación a la baja también es rápida pues ya no se observan cambios a los 90

min, lo anterior concuerda con los trabajos de Besnard et al. (2013), Miyashita et al. (2008) y Rao et al. (2006). Por otra parte, trabajos previos habían sugerido que la expresión de *zif268* se mantenía incrementada incluso por 2 h después de la reexposición al contexto de aprendizaje (Besnard et al., 2013; Lee et al., 2004; Zangenehpour & Chaudhuri, 2002); nuestros resultados sugieren que este mantenimiento en la expresión depende de la estructura en estudio, ya que en el hipocampo se observa una expresión sostenida hasta los 180 min después de la evocación mientras que en la amígdala solo se observaron cambios a los 30 min.

Los cambios en el estriado sugieren que podría estar ocurriendo una remodelación rápida de las sinapsis en esta estructura a través de la interacción de *arc* con los receptores AMPA, esto posiblemente porque es una de las regiones cerebrales que es primeramente activada durante la evocación. Por otra parte los cambios observados en la amígdala nos indican que la evocación podría estar iniciando una oleada de expresión génica tardía regulada por el factor de transcripción *zif268*, y esto nos indicaría que la amígdala es una estructura secundaria en los procesos plásticos iniciados por la evocación; por la temporalidad de los eventos que inicia *zif268*, sería más fácil interferir con la actividad de la amígdala para influir con la conducta aprendida porque los cambios celulares tienen mayor duración.

El uso de inhibidores de síntesis de proteínas antes de la evocación nos da una visión general de la participación de la síntesis *de novo* de proteínas en la extinción; sin embargo no hay que perder de vista que los inhibidores de síntesis de proteínas no nos indican la identidad de las proteínas inhibidas, ya que bloquean de manera general la traducción. Esta aproximación general nos permitió determinar que para la evitación activa la primera sesión de reexposición al contexto de aprendizaje, ya sin la consecuencia aversiva, es crucial para modificar la conducta aprendida; esto había sido previamente demostrado en otros paradigmas conductuales como el condicionamiento de aversión de los sabores y la evitación inhibitoria (Berman & Dudai, 2001; Cammarota, Bevilaqua, Rossato, et al., 2005). Estos resultados nos sugieren que es en esta primera sesión que se induce la síntesis de proteínas relevantes para el establecimiento de la extinción y que en reexposiciones posteriores este proceso ya no tiene un papel primordial. Sin embargo, esta sensibilidad al inhibidor de síntesis de proteínas es dependiente de la fortaleza de la memoria reactivada. Esta fortaleza está dada por la intensidad del estímulo aversivo empleada durante el

entrenamiento; parece ser que conforme esta intensidad es mayor la conducta aprendida se vuelve insensible a la modificación mediante el tratamiento con el inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida. Estudios previos habían sugerido que el bloqueo con inhibidores de síntesis de proteínas durante o poco después de la reactivación de una memoria débil provocan un retraso en la extinción, mientras que estos mismos tratamientos cuando se reactiva una memoria robusta provocan una aceleración de la extinción o interfieren con la reconsolidación (Eisenberg et al., 2003; Fischer et al., 2004). Esta propuesta se basa en experimentos en los que se varió el número de sesiones de entrenamiento (Eisenberg et al., 2003); otra forma de generar memorias con distinta fortaleza es empleando distintas intensidades de estímulo incondicionado durante el entrenamiento (Galindo et al., 2008; Garín-Aguilar et al., 2012). Si la propuesta de la relación entre la intensidad de la memoria y el efecto de los inhibidores de síntesis de proteínas es correcta entonces deberíamos encontrar que con una intensidad baja de choque eléctrico en el entrenamiento de evitación activa, un inhibidor de síntesis de proteínas provocaría un retraso en la extinción, mientras que cuando se emplea la intensidad alta de choque se produciría una aceleración de la extinción. Nuestros resultados muestran que esto no se cumple. El efecto de la cicloheximida cuando se reactiva una memoria débil efectivamente es el de retrasar la extinción mientras que cuando se reactiva una memoria fuerte ya no se observa un efecto sustancial en la extinción. Así como había sido reportado para la consolidación de la memoria (Díaz-Trujillo et al., 2009) ahora se demuestra que para la extinción el entrenamiento con una intensidad alta de choque vuelve insensible a esa memoria al tratamiento con inhibidores de síntesis de proteínas.

Diversos trabajos han demostrado que cuando se incrementa la intensidad del estímulo incondicionado empleado durante el entrenamiento, la memoria se vuelve insensible a tratamientos que producen amnesia cuando la intensidad del estímulo incondicionado fue baja; entre estos tratamientos se encuentran bloqueadores de distintos sistemas de neurotransmisión como el colinérgico y serotoninérgico, el bloqueo reversible de la actividad cerebral y la inhibición de la síntesis de proteínas (Prado-Alcalá et al., 2012). Los cambios neuronales que permiten el establecimiento de la memoria podrían estar dados por modificaciones post-traduccionales como fue sugerido por Routtenberg y Rekart (2005); uno de los candidatos mas fuertes es la fosforilación de proteínas, en

especial de ERK cuya importancia en distintas etapas de la memoria ha sido demostrada en diversos paradigmas (Peng et al., 2010). Aún se desconoce qué es lo que permite formar una memoria estable ante condiciones altas de entrenamiento y en este trabajo demostramos que también se desconocen los elementos que guían la extinción de una memoria formada con una intensidad alta de estímulo aversivo empleada durante el entrenamiento.

Finalmente es relevante comentar nuestros resultados a la luz de la reconsolidación ya que existe una delgada línea entre la extinción y la reconsolidación. Al analizar la expresión génica después de la primera sesión de prueba en la tarea de evitación inhibitoria podríamos también considerar que ésta fue una sesión de extinción; sin embargo es difícil hacer esa aseveración ya que los animales tuvieron una muy buena memoria demostrado por latencias de retención altas (Figura 8 y Figura 13). A pesar de que no se realizó una curva de extinción en los experimentos de expresión génica, el trabajo de Garín-Aguilar et al. (2012) sugiere que estos animales hubieran requerido varias sesiones de reexposición al contexto para dar signos de extinción. Por lo anterior no podemos saber si los cambios en la expresión estarían asociados al principio del proceso de extinción o al proceso de reconsolidación en el cual aún se mantiene la respuesta condicionada. Asimismo es posible que la intensidad de choque empleada sea aquella como la denominada “limbo” en el cual los cambios moleculares observados no sean lo suficientemente fuertes para promover la extinción ni la reconsolidación.

Por otra parte nuestro trabajo sobre el inhibidor de síntesis de proteínas empleado durante la extinción de evitación activa demuestra claramente que para esta tarea y con las intensidades de choque empleadas no se puede interferir con el proceso de reconsolidación ya que en ningún caso se observó una disminución de la respuesta condicionada, esto apoya la literatura de que sólo en condiciones muy particulares una memoria “original” puede ser alterada al grado de ser eliminada (Suzuki et al., 2004).



## 9 CONCLUSIONES

Al realizar el análisis de los genes que se inducen después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria encontramos que la expresión de *chrm1* y de *erk1* en el estriado y en la amígdala no se alteró como resultado de la evocación de esta tarea. Diversos trabajos demuestran que como resultado de la evocación aumentan los niveles de acetilcolina cerebral, se activan receptores de acetilcolina y se sintetizan nuevos receptores M1; nuestro trabajo sugiere que el incremento en los niveles del receptor M1 producido por la evocación estaría ocurriendo de manera independiente del incremento del ARNm de *chrm1*. Por otra parte, varios trabajos previos habían sugerido que la principal modulación que sufre ERK en procesos cognoscitivos es a nivel de su fosforilación y no a nivel de proteína, nuestro trabajo muestra que a nivel de expresión génica el mensajero de ERK tampoco se modifica por la evocación.

La expresión génica de *arc* en el estriado estudiada 30 min después de reexponer a los animales a la cámara de entrenamiento estuvo claramente asociada a la evocación de la memoria, ya que se observó un incremento sólo en animales que efectivamente formaron una memoria y no en grupos control, lo que descarta la posible expresión inducida por la reexposición a un contexto o por actividad motora. La expresión de *zif268* en esta misma estructura también estuvo asociada a la reexposición al contexto. Debido a las entradas de información de múltiples modalidades, la activación de IEGs nos sugiere que el estriado dorsal estaría procesando información correspondiente a la evocación de distintos aspectos de la tarea de evitación inhibitoria.

En la amígdala encontramos que la expresión de *arc* se indujo por la reexposición a la cámara de entrenamiento, mientras que los cambios observados en *zif268* 30 min después de la evocación podrían estar relacionados con la evocación de la asociación entre el contexto y la consecuencia aversiva. La amígdala ha sido vista como un modulador de la evocación sin embargo, nuestros resultados sugieren que la amígdala no sólo coordina la actividad de múltiples regiones cerebrales sino que también se activa por la evocación, y a través de la acción de *zif268* estaría implicada en mantener o modificar la información almacenada.

La expresión de *arc* y de *zif268* en el hipocampo estuvo asociada a la reexposición al contexto. Cabe resaltar que una reexposición por menos de 60 seg a la cámara de entrenamiento indujo cambios grandes de la expresión de *arc*. Los cambios en la expresión de *arc* fueron observados a los 30 min mientras que los incrementos en la expresión de *zif268* se observaron a los 30, 90 y 180 min después de la evocación. En conjunto nuestros resultados sugieren que la expresión de *arc* y *zif268* en el hipocampo se induce por el reconocimiento de la cámara de evitación inhibitoria y que la regulación a la baja de *arc* es más rápida que la regulación de *zif268*.

Cuando realizamos un bloqueo general de la síntesis de proteínas en diferentes sesiones de extinción de la tarea de evitación activa encontramos que la administración de CXM produjo un efecto diferencial en la extinción dependiendo del momento de inyección y de la intensidad de entrenamiento. El establecimiento de la extinción se retrasó en animales que fueron entrenados con la intensidad baja y que recibieron CXM antes de la primera sesión de extinción. En animales que fueron entrenados con la intensidad alta y que recibieron CXM antes de la primera sesión de extinción, la extinción sólo se vio afectada en esa primera sesión mientras que este aprendizaje se desarrolló adecuadamente en las sesiones subsecuentes.

La administración de CXM antes de la segunda o tercera sesión de extinción no interfirió con la extinción en animales entrenados con la intensidad baja ni con la alta.

Nuestros resultados indican que el entrenamiento en la tarea de evitación activa empleando una intensidad baja genera una memoria débil y que la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas retrasa el establecimiento de la extinción en estas condiciones. Por otra parte el entrenamiento en esta misma tarea ahora empleando una intensidad más alta genera una memoria fuerte, y bajo estas condiciones el proceso de extinción no es interferido substancialmente por el inhibidor de la síntesis de proteínas.

En conjunto, nuestros datos nos permiten proponer que el efecto del inhibidor de síntesis de proteínas CXM depende de la intensidad con la que fueron entrenados los animales; lo anterior no apoya la idea de que el bloqueo de la síntesis de proteínas *de novo* interfiera siempre con la extinción.

## 10 ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cámara de entrenamiento empleada en las tareas de evitación inhibitoria y de evitación activa. ....	4
<b>Figura 2.</b> Eventos moleculares que participan en las etapas de la memoria.....	7
<b>Figura 3.</b> Ganglios basales y sus conexiones neuronales.....	11
<b>Figura 4.</b> Principales núcleos de la amígdala y sus subdivisiones .....	18
<b>Figura 5</b> Vías de comunicación neuronal en la formación hipocampal.....	19
<b>Figura 6.</b> Cambios en la fosforilación y síntesis de proteínas después de la evocación en el condicionamiento de miedo al contexto.....	23
<b>Figura 7.</b> Esquema de los grupos empleados para el análisis de la expresión génica después de la evocación.....	38
<b>Figura 8.</b> Latencias en la tarea de evitación inhibitoria para el análisis de la expresión génica a los 90 min (Experimento1A).....	43
<b>Figura 9.</b> Curvas de eficiencia de muestras de estriado obtenidas 90 min después de la evocación .....	44
<b>Figura 10.</b> Curvas de eficiencia de muestras de amígdala obtenidas 90 min después de la evocación .....	44
<b>Figura 11.</b> Expresión génica en el estriado 90 min después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria.....	46
<b>Figura 12.</b> Expresión génica en la amígdala 90 min después de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria.....	47
<b>Figura 13.</b> Latencias en la tarea de evitación inhibitoria correspondientes a los grupos sacrificados a los 30, 90 o 180 min después de la prueba de retención.....	50
<b>Figura 14.</b> Curvas de eficiencia de muestras de estriado obtenidas a distintos tiempos después de la evocación.....	51
<b>Figura 15.</b> Curvas de eficiencia de muestras de amígdala obtenidas a distintos tiempos después de la evocación.....	52
<b>Figura 16.</b> Curvas de eficiencia de muestras de hipocampo obtenidas a distintos tiempos después de la evocación.....	52
<b>Figura 17.</b> Expresión génica en el estriado después de que transcurrieron 30, 90 o 180 min de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria .....	55
<b>Figura 18.</b> Expresión génica en la amígdala después de que transcurrieron 30, 90 o 180 min de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria .....	57
<b>Figura 19.</b> Expresión génica en el hipocampo después de que transcurrieron 30, 90 o 180 min de la evocación en la tarea de evitación inhibitoria .....	60
<b>Figura 20.</b> Comparación de la expresión de <i>zif268</i> en el estriado en el experimento 1A y 1B.....	61
<b>Figura 21.</b> Comparación de la expresión de <i>arc</i> en la amígdala en el experimento realizado a los 90 min y la curva temporal .....	61
<b>Figura 22.</b> Representación de las etapas de la memoria y del proceso de extinción y de los efectos de los inhibidores de síntesis de proteínas (ISPs) sobre este proceso.....	75
<b>Figura 23.</b> Aciertos en la tarea de evitación activa .....	82
<b>Figura 24.</b> Latencias de cruce en la tarea de evitación activa .....	83

## 11 ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Requisitos moleculares de la memoria .....	8
<b>Tabla II.</b> Estudios en los que se han observado incrementos en la expresión génica después de la evocación .....	17
<b>Tabla III.</b> Estudios en los que se han observado incrementos en proteínas después de la evocación .....	21
<b>Tabla IV.</b> Características genómicas de <i>c-fos</i> , <i>zif268</i> , <i>arc</i> y <i>homer1a</i> .....	27
<b>Tabla V.</b> Oligonucleótidos empleados y sus características bioquímicas .....	40
<b>Tabla VI.</b> Análisis de Normfinder para la elección del gen de referencia en el Experimento 1A .....	45
<b>Tabla VII.</b> Análisis de Normfinder para la elección del gen de referencia para el Experimento 1B .....	53

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R., & Bourchouladze, R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*, *88*(5), 615–626.
- Amalric, M., & Koob, G. F. (1993). Functionally selective neurochemical afferents and efferents of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine system. *Progress in Brain Research*, *99*, 209–226.
- Andersen, C. L. (2004). Normalization of Real-Time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, *64*(15), 5245–5250. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M., & Sweatt, J. D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, *1*(7), 602–609. <http://doi.org/10.1038/2836>
- Barros, D. M., Izquierdo, L. A., Mello e Souza, T., Ardenghi, P. G., Pereira, P., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behavioural Brain Research*, *114*(1–2), 183–192. [http://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00226-6](http://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00226-6)
- Barros, D. M., Mello e Souza, T., De David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., ... Izquierdo, I. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1,  $\beta$ -noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavioural Brain Research*, *124*(1), 1–7. [http://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00208-X](http://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00208-X)
- Bast, T., da Silva, B. M., & Morris, R. G. M. (2005). Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. *The Journal of Neuroscience*, *25*(25), 5845–5856. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0698-05.2005>
- Berkeley, J. (2001). M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *18*(5), 512–524. <http://doi.org/10.1006/mcne.2001.1042>
- Berlau, D. J., & McGaugh, J. L. (2006). Enhancement of extinction memory consolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory*, *86*(2), 123–132. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.12.008>
- Berman, D. E., & Dudai, Y. (2001). Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, *291*(5512), 2417–2419. <http://doi.org/10.1126/science.1058165>
- Besnard, A., Laroche, S., & Caboche, J. (2013). Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Structure and Function*, *219*(1), 415–430. <http://doi.org/10.1007/s00429-013-0505-y>
- Boccia, M. M., Blake, M. G., Baratti, C. M., & McGaugh, J. L. (2009). Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiology of*

- Learning and Memory*, 91(1), 93–97. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.012>
- Bonefeld, B. E., Elfving, B., & Wegener, G. (2008). Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse*, 62(4), 302–309. <http://doi.org/10.1002/syn.20496>
- Botreau, F., El Massioui, N., Chérueil, F., & Gisquet-Verrier, P. (2004). Effects of medial prefrontal cortex and dorsal striatum lesions on retrieval processes in rats. *Neuroscience*, 129(3), 539–553. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.032>
- Bottai, D., Guzowski, J. F., Schwarz, M. K., Kang, S. H., Xiao, B., Lanahan, A., ... Seeburg, P. H. (2002). Synaptic activity-induced conversion of intronic to exonic sequence in homer 1 immediate early gene expression. *The Journal of Neuroscience*, 22(1), 167–175.
- Bouton, M. E. (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychological Bulletin*, 114(1), 80–99.
- Bouton, M. E., Westbrook, R. F., Corcoran, K. A., & Maren, S. (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biological Psychiatry*, 60(4), 352–360. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.12.015>
- Bozon, B., Davis, S., & Laroche, S. (2002). Regulated transcription of the immediate-early gene Zif268: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation. *Hippocampus*, 12(5), 570–577. <http://doi.org/10.1002/hipo.10100>
- Braud, W. G., & Broussard, W. J. (1973). Effects of puromycin on memory for shuttle box extinction in goldfish and barpress extinction in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 1(6), 651–656.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., & Bernardi, G. (1999). Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP. *Neuropharmacology*, 38(2), 323–326.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. A., Pisani, A., Sancesario, G., & Bernardi, G. (2000). Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 61(3), 231–265.
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N. B., & Bernardi, G. (1992). Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *The Journal of Neuroscience*, 12(11), 4224–4233.
- Calabresi, P., Mercuri, N. B., De Murtas, M., & Bernardi, G. (1991). Involvement of GABA systems in feedback regulation of glutamate-and GABA-mediated synaptic potentials in rat neostriatum. *The Journal of Physiology*, 440, 581–599.
- Cammarota, M., Barros, D. M., Vianna, M. R., Bevilaqua, L. R., Coitinho, A., Szapiro, G., ... Izquierdo, I. (2004). The transition from memory retrieval to extinction. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 76(3), 573–582.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Barros, D. M., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Retrieval and the extinction of memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(3-4), 465–474. <http://doi.org/10.1007/s10571-005-4009-z>
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Ramirez, M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2005). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(1), 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.03.002>
- Changelian, P. S., Feng, P., King, T. C., & Milbrandt, J. (1989). Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(1), 377–381.
- Chauveau, F., Tronche, C., Piérard, C., Liscia, P., Drouet, I., Coutan, M., & Béracochéa, D. (2010). Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus*, 20(1), 196–207. <http://doi.org/10.1002/hipo.20605>
- Cheval, H., Chagneau, C., Levasseur, G., Veyrac, A., Faucon-Bigué, N., Laroche, S., & Davis, S. (2012). Distinctive features of Egr transcription factor regulation and DNA binding activity in CA1 of the hippocampus in synaptic plasticity and consolidation and reconsolidation of fear memory. *Hippocampus*, 22(3), 631–642. <http://doi.org/10.1002/hipo.20926>
- Choi, J.-H., Kim, J.-E., & Kaang, B.-K. (2010). Protein synthesis and degradation are required for the incorporation of modified information into the pre-existing object-location memory. *Molecular Brain*, 3(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1756-6606-3-1>
- Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., ... Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52(3), 445–459. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033>
- Clayton, D. F. (2000). The genomic action potential. *Neurobiology of Learning and Memory*, 74(3), 185–216. <http://doi.org/10.1006/nlme.2000.3967>

- Cohen, J., & Gotthard, G. H. (2011). Extinction of appetitive learning is disrupted by cycloheximide and propranolol in the sand maze in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 95(4), 484–490. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.011>
- Cole, A. J., Bhat, R. V., Patt, C., Worley, P. F., & Baraban, J. M. (1992). D1 dopamine receptor activation of multiple transcription factor genes in rat striatum. *Journal of Neurochemistry*, 58(4), 1420–1426. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb11358.x>
- Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., & Worley, P. F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature*, 340(6233), 474–476. <http://doi.org/10.1038/340474a0>
- Corbit, L. H., Muir, J. L., & Balleine, B. W. (2001). The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *The Journal of Neuroscience*, 21(9), 3251–3260.
- Daberkow, D. P., Riedy, M. D., Kesner, R. P., & Keefe, K. A. (2007). Arc mRNA induction in striatal efferent neurons associated with response learning. *European Journal of Neuroscience*, 26(1), 228–241. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05630.x>
- Dang, M. T., Yokoi, F., Yin, H. H., Lovinger, D. M., Wang, Y., & Li, Y. (2006). Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15254–15259. <http://doi.org/10.1073/pnas.0601758103>
- Davis, S., & Laroche, S. (2006). Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes, Brain and Behavior*, 5, 61–72. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00230.x>
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., & Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 20(12), 4563–4572.
- Day, J. J., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*, 70(5), 813–829. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019>
- De la Fuente, V., Freudenthal, R., & Romano, A. (2011). Reconsolidation or extinction: Transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *The Journal of Neuroscience*, 31(15), 5562–5573. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6066-10.2011>
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(5), 339–350. <http://doi.org/10.1038/nrn2822>
- De Quervain, D. J. F., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, 394(6695), 787–790. <http://doi.org/10.1038/29542>
- Díaz-Trujillo, A., Contreras, J., Medina, A. C., Silveyra-Leon, G. A., Antaramian, A., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(3), 310–314. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.10.006>
- Donai, H., Sugiura, H., Ara, D., Yoshimura, Y., Yamagata, K., & Yamauchi, T. (2003). Interaction of Arc with CaM kinase II and stimulation of neurite extension by Arc in neuroblastoma cells expressing CaM kinase II. *Neuroscience Research*, 47(4), 399–408. <http://doi.org/10.1016/j.neures.2003.08.004>
- Doyère, V., Dèbiec, J., Monfils, M.-H., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2007). Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nature Neuroscience*, 10(4), 414–416. <http://doi.org/10.1038/nn1871>
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, 55, 51–86. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Ebert, S. N., Balt, S. L., Hunter, J. P., Gashler, A., Sukhatme, V., & Wong, D. L. (1994). Egr-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 20885–20898.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E., & Dudai, Y. (2003). Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5636), 1102–1104. <http://doi.org/10.1126/science.1086881>
- Falls, W. A., Miserendino, M. J., & Davis, M. (1992). Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 12(3), 854–863.
- Fenu, S., Bassareo, V., & Di Chiara, G. (2001). A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6897–6904.

- Fischer, A., Sananbenesi, F., Schrick, C., Spiess, J., & Radulovic, J. (2004). Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *The Journal of Neuroscience*, 24(8), 1962–1966. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5112-03.2004>
- Fitzgerald, K. A., & O'Neill, L. A. (1999). Characterization of CD44 induction by IL-1: a critical role for Egr-1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(8), 4920–4927.
- Flood, J. F., Jarvik, M. E., Bennett, E. L., Orme, A. E., & Rosenzweig, M. R. (1977). Protein synthesis inhibition and memory for pole jump active avoidance and extinction. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 7(1), 71–77.
- Flores, L. C., & Disterhoft, J. F. (2013). Caudate nucleus in retrieval of trace eyeblink conditioning after consolidation. *Journal of Neuroscience*, 33(7), 2828–2836. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2326-12.2013>
- Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L., & Silva, A. J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, 304(5672), 881–883.
- Fujimoto, T., Tanaka, H., Kumamaru, E., Okamura, K., & Miki, N. (2004). Arc interacts with microtubules/microtubule-associated protein 2 and attenuates microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the dendrites. *Journal of Neuroscience Research*, 76(1), 51–63. <http://doi.org/10.1002/jnr.20056>
- Fukushima, H., Zhang, Y., Archbold, G., Ishikawa, R., Nader, K., & Kida, S. (2014). Enhancement of fear memory by retrieval through reconsolidation. *eLife*, 3, e02736. <http://doi.org/10.7554/eLife.02736>
- Galindo, L. E., Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Serafín, N., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2008). Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 153–158. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.01.011>
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G. L., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., & Prado-Alcalá, R. A. (2012). Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 1–6. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00012>
- Gold, P. E., & Wrenn, S. M. (2012). Cycloheximide impairs and enhances memory depending on dose and footshock intensity. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 293–297. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.010>
- González-Salinas, S. (2009). *Técnicas empleadas en el estudio de la consolidación de la memoria y uso de los microarreglos para la identificación de firmas transcripcionales* (Tesis de Licenciatura). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.
- González-Salinas, S., Quirarte, G. L., Medina, A. C., & Prado-Alcalá, R. A. (en prensa). Consolidation, retrieval, and extinction: dissimilar molecular requirements. In *Synaptic fundamentals of memory performance*.
- Gordon, W. C. (1977). Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: a time-dependent phenomenon. *Physiology & Behavior*, 18(1), 95–99.
- Gotthard, G. H., & Knoppel, A. B. (2010). Cycloheximide produces amnesia for extinction and reconsolidation in an appetitive odor discrimination task in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(1), 127–131. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.09.002>
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., & Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science (New York, N. Y.)*, 234(4772), 80–83.
- Grillner, S., Hellgren, J., Ménard, A., Saitoh, K., & Wikström, M. A. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends in Neurosciences*, 28(7), 364–370. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2005.05.004>
- Groenewegen, H. J., Berendse, H. W., Wolters, J. G., & Lohman, A. H. (1990). The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *Progress in Brain Research*, 85, 95–116; discussion 116–118.
- Groth, R. D., Dunbar, R. L., & Mermelstein, P. G. (2003). Calcineurin regulation of neuronal plasticity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(4), 1159–1171. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.002>
- Gurney, K., Prescott, T. J., Wickens, J. R., & Redgrave, P. (2004). Computational models of the basal ganglia: from robots to membranes. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 453–459. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.003>
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2000). Inhibition of activity-dependent Arc protein expression in the rat hippocampus Impairs the

- maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 3993–4001.
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*, 2(12), 1120–1124. <http://doi.org/10.1038/16046>
- Guzowski, J. F., Miyashita, T., Chawla, M. K., Sanderson, J., Maes, L. I., Houston, F. P., ... Barnes, C. A. (2006). Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and *Arc* gene transcription in hippocampal CA1 neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 1077–1082. <http://doi.org/10.1073/pnas.0505519103>
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *arc*, *c-fos*, and *zif268*. *The Journal of Neuroscience*, 21(14), 5089–5098.
- Guzowski, J. F., Timlin, J. A., Roysam, B., McNaughton, B. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5), 599–606. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.018>
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001a). Cellular imaging of *zif268* expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *The Journal of Neuroscience*, 21(6), 2186–2193.
- Hall, J., Thomas, K. L., & Everitt, B. J. (2001b). Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 13(7), 1453–1458. <http://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01531.x>
- Halvorson, L. M., Ito, M., Jameson, J. L., & Chin, W. W. (1998). Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone  $\beta$ -subunit gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14712–14720. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14712>
- Hamilton, S. E., & Nathanson, N. M. (2001). The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15850–15853. <http://doi.org/10.1074/jbc.M011563200>
- Herry, C., Trifilieff, P., Micheau, J., Lüthi, A., & Mons, N. (2006). Extinction of auditory fear conditioning requires MAPK/ERK activation in the basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 24(1), 261–269. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04893.x>
- Hodge, C., Liao, J., Stofega, M., Guan, K., Carter-Su, C., & Schwartz, J. (1998). Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of *elk-1* and expression of *c-fos*, *egr-1*, and *junB* through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31327–31336.
- Huang, C.-H., Chiang, Y.-W., Liang, K.-C., Thompson, R. F., & Liu, I. Y. (2010). Extra-cellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activated in the hippocampal CA1 neurons is critical for retrieval of auditory trace fear memory. *Brain Research*, 1326, 143–151. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.033>
- Hughes, P., & Dragunow, M. (1994). Activation of pirenzepine-sensitive muscarinic receptors induces a specific pattern of immediate-early gene expression in rat brain neurons. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 24(1-4), 166–178.
- Hughes, P., & Dragunow, M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*, 47(1), 133–178.
- Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6781–6789. <http://doi.org/20026642>
- Izaki, Y., Hori, K., & Nomura, M. (2001). Elevation of prefrontal acetylcholine is related to the extinction of learned behavior in rats. *Neuroscience Letters*, 306(1–2), 33–36. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01863-8](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01863-8)
- Izquierdo, A., Wellman, C. L., & Holmes, A. (2006). Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *The Journal of Neuroscience*, 26(21), 5733–5738. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0474-06.2006>
- James, A. B., Conway, A.-M., & Morris, B. J. (2006). Regulation of the neuronal proteasome by *Zif268* (*Egr1*). *The Journal of Neuroscience*, 26(5), 1624–1634. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4199-05.2006>
- Jansen, E., Ayoubi, T. A., Meulemans, S. M., & Van De Ven, W. J. (1997). Regulation of human prohormone convertase 2 promoter activity by the transcription factor *EGR-1*. *The Biochemical Journal*, 328 ( Pt 1),



69–74.

- Jöels, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(6), 459–466. <http://doi.org/10.1038/nrn2632>
- Jones, M. W., Errington, M. L., French, P. J., Fine, A., Bliss, T. V. P., Garel, S., ... Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience*, *4*(3), 289–296. <http://doi.org/10.1038/85138>
- Kawashima, T., Okuno, H., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Kyo, N., Okamura, M., ... Bito, H. (2009). Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(1), 316–321. <http://doi.org/10.1073/pnas.0806518106>
- Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *27*(8), 765–776. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.015>
- Kelly, A., Laroche, S., & Davis, S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(12), 5354–5360.
- Kennedy, M. B. (1997). The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends in Neurosciences*, *20*(6), 264–268.
- Kessels, H. W., & Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, *61*(3), 340–350. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015>
- Kim, J., Lee, S., Park, H., Song, B., Hong, I., Geum, D., ... Choi, S. (2007). Blockade of amygdala metabotropic glutamate receptor subtype 1 impairs fear extinction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *355*(1), 188–193. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.125>
- Kim, S. J., Park, K., Rudkin, B. B., Dey, B. R., Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1994). Nerve growth factor induces transcription of transforming growth factor-beta 1 through a specific promoter element in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(5), 3739–3744.
- Knapska, E., Radwanska, K., Werka, T., & Kaczmarek, L. (2007). Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiological Reviews*, *87*(4), 1113–1173. <http://doi.org/10.1152/physrev.00037.2006>
- Konorski, J. (1967). *Integrative activity of the brain: an interdisciplinary approach*. University of Chicago Press.
- Kwon, J.-T., Jhang, J., Kim, H.-S., Lee, S., & Han, J.-H. (2012). Brain region-specific activity patterns after recent or remote memory retrieval of auditory conditioned fear. *Learning & Memory*, *19*(10), 487–494. <http://doi.org/10.1101/lm.025502.112>
- Lattal, K. M., & Abel, T. (2001). Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *The Journal of Neuroscience*, *21*(15), 5773–5780.
- Lattal, K. M., Honarvar, S., & Abel, T. (2004). Effects of post-session injections of anisomycin on the extinction of a spatial preference and on the acquisition of a spatial reversal preference. *Behavioural Brain Research*, *153*(2), 327–339. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.12.009>
- Lattal, K. M., & Lattal, K. A. (2012). Facets of Pavlovian and operant extinction. *Behavioural Processes*, *90*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.03.009>
- Lee, H., & Kim, J. J. (1998). Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *The Journal of Neuroscience*, *18*(20), 8444–8454.
- Lee, J. L. C., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, *304*(5672), 839–843. <http://doi.org/10.1126/science.1095760>
- Lewis, D. J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychological Bulletin*, *86*(5), 1054–1083.
- Lin, C.-H., Yeh, S.-H., Leu, T.-H., Chang, W.-C., Wang, S.-T., & Gean, P.-W. (2003). Identification of calcineurin as a key signal in the extinction of fear memory. *The Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1574–1579.
- Lin, C.-H., Yeh, S.-H., Lu, H.-Y., & Gean, P.-W. (2003). The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *The Journal of Neuroscience*, *23*(23), 8310–8317.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(12), 5734–5738.

- Lin, P.-Y., Wang, S.-P., Tai, M.-Y., & Tsai, Y.-F. (2010). Differential involvement of medial prefrontal cortex and basolateral amygdala extracellular signal-regulated kinase in extinction of conditioned taste aversion is dependent on different intervals of extinction following conditioning. *Neuroscience*, *171*(1), 125–133. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.066>
- Lisman, J. E. (1985). A mechanism for memory storage insensitive to molecular turnover: a bistable autophosphorylating kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *82*(9), 3055–3057.
- Liste, I., Rozas, G., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (1995). Cortical stimulation induces Fos expression in striatal neurons via NMDA glutamate and dopamine receptors. *Brain Research*, *700*(1-2), 1–12.
- Liu, C., Yao, J., de Belle, I., Huang, R. P., Adamson, E., & Mercola, D. (1999). The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(7), 4400–4411.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loftus, E. F., & Pickrell, J. E. (1995). The formation of false memories. *Psychiatric Annals*, *25*(12), 720–725.
- Lovinger, D. M., & McCool, B. A. (1995). Metabotropic glutamate receptor-mediated presynaptic depression at corticostriatal synapses involves mGluR2 or 3. *Journal of Neurophysiology*, *73*(3), 1076–1083.
- Lozano, Y. R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B., & Quirarte, G. L. (2013). Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *101*, 55–64. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.001>
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., ... Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, *14*(2), 433–445. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90299-6](http://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90299-6)
- Lynch, G., & Baudry, M. (1984). The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science*, *224*(4653), 1057–1063.
- Maddox, S. A., Monsey, M. S., & Schafe, G. E. (2011). Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learning & Memory*, *18*(1), 24–38. <http://doi.org/10.1101/lm.1980211>
- Maddox, S. A., & Schafe, G. E. (2011). The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (arc/arg3.1) is required for reconsolidation of a pavlovian fear memory. *The Journal of Neuroscience*, *31*(19), 7073–7082. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1120-11.2011>
- Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P. W., & Kida, S. (2009). Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *The Journal of Neuroscience*, *29*(2), 402–413. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4639-08.2009>
- Maruki, K., Izaki, Y., Akema, T., & Nomura, M. (2003). Effects of acetylcholine antagonist injection into the prefrontal cortex on the progress of lever-press extinction in rats. *Neuroscience Letters*, *351*(2), 95–98. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.07.012>
- Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., ... Brambilla, R. (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*, *34*(5), 807–820. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00716-X](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00716-X)
- McIntyre, C. K., Miyashita, T., Setlow, B., Marjon, K. D., Steward, O., Guzowski, J. F., & McGaugh, J. L. (2005). Memory-influencing intra-basolateral amygdala drug infusions modulate expression of Arc protein in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(30), 10718–10723. <http://doi.org/10.1073/pnas.0504436102>
- Mello, C., Nottebohm, F., & Clayton, D. (1995). Repeated exposure to one song leads to a rapid and persistent decline in an immediate early gene's response to that song in zebra finch telencephalon. *The Journal of Neuroscience*, *15*(10), 6919–6925.
- Merlo, E., Milton, A. L., Goozee, Z. Y., Theobald, D. E., & Everitt, B. J. (2014). Reconsolidation and extinction are dissociable and mutually exclusive processes: behavioral and molecular evidence. *Journal of Neuroscience*, *34*(7), 2422–2431. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4001-13.2014>
- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2012). Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of

- progress. *Annual Review of Psychology*, 63(1), 129–151. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.131631>
- Milekic, M. H., Brown, S. D., Castellini, C., & Alberini, C. M. (2006). Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *The Journal of Neuroscience*, 26(11), 3010–3020. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4818-05.2006>
- Minc, E., de Coppet, P., Masson, P., Thiery, L., Dutertre, S., Amor-Gu eret, M., & Jaulin, C. (1999). The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1), 503–509.
- Misanin, J. R., Miller, R. R., & Lewis, D. J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science*, 160(3827), 554–555.
- Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G., & Guzowski, J. F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 269–284. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.012>
- Mokin, M., Lindahl, J. S., & Keifer, J. (2006). Immediate-early gene-encoded protein Arc is associated with synaptic delivery of GluR4-containing AMPA receptors during In vitro classical conditioning. *Journal of Neurophysiology*, 95(1), 215–224. <http://doi.org/10.1152/jn.00737.2005>
- Montag-Sallaz, M., & Montag, D. (2003). Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learning & Memory*, 10(2), 99–107. <http://doi.org/10.1101/lm.53403>
- Morris, R. G. M., Inglis, J., Ainge, J. A., Olverman, H. J., Tulloch, J., Dudai, Y., & Kelly, P. A. T. (2006). Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*, 50(3), 479–489. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.012>
- Mueller, D., Porter, J. T., & Quirk, G. J. (2008). Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. *The Journal of Neuroscience*, 28(2), 369–375. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3248-07.2008>
- Murchison, C. F., Zhang, X.-Y., Zhang, W.-P., Ouyang, M., Lee, A., & Thomas, S. A. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. *Cell*, 117(1), 131–143. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00259-4](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00259-4)
- Myers, K. M., & Davis, M. (2006). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120–150.
- Myskiw, J. C., Fiorenza, N. G., Izquierdo, L. A., & Izquierdo, I. (2010). Molecular mechanisms in hippocampus and basolateral amygdala but not in parietal or cingulate cortex are involved in extinction of one-trial avoidance learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 94(2), 285–291. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.06.007>
- Nader, K., & Einarsson, E. O. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1191, 27–41. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x>
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. <http://doi.org/10.1038/35021052>
- Nakano, K., Kayahara, T., Tsutsumi, T., & Ushiro, H. (2000). Neural circuits and functional organization of the striatum. *Journal of Neurology*, 247 Suppl 5, V1–15.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). Washington (DC): National Academies Press (US). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
- Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Research*, 69(3), 175–186. <http://doi.org/10.1016/j.neures.2010.12.007>
- Ortega, A., D az del Guante, M. A., Prado-Alcal a, R. A., & Alem an, V. (1996). Changes in rat brain muscarinic receptors after inhibitory avoidance learning. *Life Sciences*, 58(9), 799–809.
- Packard, M. G., & Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 563–593. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937>
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes*. Courier Dover Publications.
- Pedreira, M. E., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, 38(6), 863–869.
- Peebles, C. L., Yoo, J., Thwin, M. T., Palop, J. J., Noebels, J. L., & Finkbeiner, S. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18173–18178. <http://doi.org/10.1073/pnas.1006546107>
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., & Ren, B. (2010). ERK in learning and memory: a review of recent research. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 222–232. <http://doi.org/10.3390/ijms11010222>

- Phillips, G. D., Setzu, E., & Hitchcott, P. K. (2003). Facilitation of appetitive pavlovian conditioning by d-amphetamine in the shell, but not the core, of the nucleus accumbens. *Behavioral Neuroscience*, *117*(4), 675–684.
- Pospelov, V., Pospelova, T., & Julien, J. (1994). AP-1 and Krox-24 transcription factors activate the neurofilament light gene promoter in P19 embryonal carcinoma cells. *Cell Growth Differentiation*, *5*(2), 187–196.
- Power, A. E., Berlau, D. J., McGaugh, J. L., & Steward, O. (2006). Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: The role of re-exposure duration. *Learning & Memory*, *13*(1), 27–34. <http://doi.org/10.1101/lm.91206>
- Prado-Alcalá, R. A., Fernández-Samblancat, M., & Solodkin-Herrera, M. (1985). Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and the maintenance of passive avoidance. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *22*(2), 243–247.
- Prado-Alcalá, R. A., Haiek, M., Rivas, S., Roldán-Roldán, G., & Quirarte, G. L. (1994). Reversal of extinction by scopolamine. *Physiology & Behavior*, *56*(1), 27–30.
- Prado-Alcalá, R. A., Medina, A. C., Serafin, N., & Quirarte, G. L. (2012). Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Reviews in the Neurosciences*, *23*(5-6), 501–508. <http://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0061>
- Quirin-Stricker, C., Mauvais, C., & Schmitt, M. (1997). Transcriptional activation of human choline acetyltransferase by AP2- and NGF-induced factors. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *49*(1-2), 165–174.
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2007). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 56–72.
- Radulovic, J., Kammermeier, J., & Spiess, J. (1998). Relationship between Fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. *The Journal of Neuroscience*, *18*(18), 7452–7461.
- Ramirez-Amaya, V. (2005). Spatial exploration-induced arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *Journal of Neuroscience*, *25*(7), 1761–1768. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005>
- Rao, V. R., Pintchovski, S. A., Chin, J., Peebles, C. L., Mitra, S., & Finkbeiner, S. (2006). AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Nature Neuroscience*, *9*(7), 887–895. <http://doi.org/10.1038/nn1708>
- Reijmers, L. G., Perkins, B. L., Matsuo, N., & Mayford, M. (2007). Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science*, *317*(5842), 1230–1233. <http://doi.org/10.1126/science.1143839>
- Rescorla, R. A., & Heth, C. D. (1975). Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, *1*(1), 88–96.
- Rial Verde, E. M., Lee-Osbourne, J., Worley, P. F., Malinow, R., & Cline, H. T. (2006). Increased expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*, *52*(3), 461–474. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.031>
- Rodriguez-Ortiz, C. J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R., & Bermudez-Rattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning & Memory*, *12*(5), 533–537. <http://doi.org/10.1101/lm.94505>
- Rodriguez-Ortiz, C. J., Garcia-DeLaTorre, P., Benavidez, E., Ballesteros, M. A., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(3), 352–359. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.004>
- Rodríguez, V. M., Limón-Pacheco, J. H., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, M. S., & Giordano, M. (2010). Chronic exposure to low levels of inorganic arsenic causes alterations in locomotor activity and in the expression of dopaminergic and antioxidant systems in the albino rat. *Neurotoxicology and Teratology*, *32*(6), 640–647. <http://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.07.005>
- Roldán-Roldán, G., Cobos-Zapiain, G., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2001). Dose- and time-dependent scopolamine-induced recovery of an inhibitory avoidance response after its extinction in rats. *Behavioural Brain Research*, *121*(1–2), 173–179. [http://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00157-7](http://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00157-7)
- Roosendaal, B. (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*(3), 578–595. <http://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>
- Roosendaal, B., Griffith, Q. K., Buranday, J., de Quervain, D. J.-F., & McGaugh, J. L. (2003). The

- hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: Dependence on the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1328–1333. <http://doi.org/10.1073/pnas.0337480100>
- Roosendaal, B., Hahn, E. L., Nathan, S. V., de Quervain, D. J.-F., & McGaugh, J. L. (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 24(37), 8161–8169. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2574-04.2004>
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research*, 66(2), 105–143. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Rossato, J. I., Bevilacqua, L. R. M., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 14(1-2), 36–46. <http://doi.org/10.1101/lm.422607>
- Rossner, S., Schliebs, R., Perez-Polo, J. R., Wiley, R. G., & Bigl, V. (1995). Differential changes in cholinergic markers from selected brain regions after specific immunolesion of the rat cholinergic basal forebrain system. *Journal of Neuroscience Research*, 40(1), 31–43. <http://doi.org/10.1002/jnr.490400105>
- Routtenberg, A., & Rekart, J. L. (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends in Neurosciences*, 28(1), 12–19. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.006>
- Sah, P., Faber, E. S. L., Armentia, M. L. D., & Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83(3), 803–834. <http://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003>
- Sala, C., Futai, K., Yamamoto, K., Worley, P. F., Hayashi, Y., & Sheng, M. (2003). Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein homer1a. *The Journal of Neuroscience*, 23(15), 6327–6337.
- Sanders, M. J., Wiltgen, B. J., & Fanselow, M. S. (2003). The place of the hippocampus in fear conditioning. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 217–223.
- Sandusky, L. A., Flint, R. W., & McNay, E. C. (2012). Effects of the protein synthesis inhibitor cycloheximide on anxiety-like extinction behavior in an animal model of post-traumatic stress. *Behavioural Brain Research*, 231(1), 208–212. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.019>
- Santini, E., Ge, H., Ren, K., Peña de Ortiz, S., & Quirk, G. J. (2004). Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 24(25), 5704–5710. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0786-04.2004>
- Santini, E., Sepulveda-Orengo, M., & Porter, J. T. (2012). Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. *Neuropsychopharmacology*, 37(9), 2047–2056. <http://doi.org/10.1038/npp.2012.52>
- Sato, M., Suzuki, K., & Nakanishi, S. (2001). NMDA receptor stimulation and brain-derived neurotrophic factor upregulate homer 1a mRNA via the Mitogen-Activated Protein Kinase cascade in cultured cerebellar granule cells. *The Journal of Neuroscience*, 21(11), 3797–3805.
- Schafe, G. E., Atkins, C. M., Swank, M. W., Bauer, E. P., Sweatt, J. D., & LeDoux, J. E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 20(21), 8177–8187.
- Schneider, A. M., & Sherman, W. (1968). Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science (New York, N.Y.)*, 159(3811), 219–221.
- Schultz, C., & Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. In *The Hippocampus in Clinical Neuroscience* (Vol. 34, pp. 6–17). Karger Medical and Scientific Publishers.
- Selcher, J. C., Nekrasova, T., Paylor, R., Landreth, G. E., & Sweatt, J. D. (2001). Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 8(1), 11–19. <http://doi.org/10.1101/lm.37001>
- Sevenster, D., Beckers, T., & Kindt, M. (2013). Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science*, 339(6121), 830–833. <http://doi.org/10.1126/science.1231357>
- Sgambato, V., Pagès, C., Rogard, M., Besson, M. J., & Caboche, J. (1998). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation. *The Journal of Neuroscience*, 18(21), 8814–8825.
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485.
- Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., & Surmeier, D. J. (2008). Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science*, 321(5890), 848–851. <http://doi.org/10.1126/science.1160575>
- Shepherd, J. D., & Huganir, R. L. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking.

- Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 613–643. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123516>
- Shiflett, M. W., Brown, R. A., & Balleine, B. W. (2010). Acquisition and performance of goal-directed instrumental actions depends on ERK signaling in distinct regions of dorsal striatum in rats. *The Journal of Neuroscience*, 30(8), 2951–2959. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1778-09.2010>
- Shiraishi-Yamaguchi, Y., & Furuichi, T. (2007). The Homer family proteins. *Genome Biology*, 8(2), 206. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-206>
- Silverman, E. S., Du, J., De Sanctis, G. T., Rådmark, O., Samuelsson, B., Drazen, J. M., & Collins, T. (1998). Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 19(2), 316–323. <http://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.2.3154>
- Simonyi, A., Murch, K., & Sun, G. Y. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 mRNA expression in the rat brain during aging. *Neurochemical Research*, 28(9), 1375–1378.
- Sonnenberg, J. L., Rauscher, F. J., Morgan, J. I., & Curran, T. (1989). Regulation of proenkephalin by Fos and Jun. *Science*, 246(4937), 1622–1625.
- Sotres-Bayon, F., Bush, D. E. A., & LeDoux, J. E. (2007). Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 32(9), 1929–1940. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301316>
- Spiers, H. J. (2012). Hippocampal Formation. In *The Encyclopedia of Human Behavior* (Vol. 2, pp. 297–304). Academic Press.
- Squire, L. R., Davis, H. P., Spanis, C. W., Gold, P. E., & Sternberg, D. B. (1980). Neurobiology of amnesia. *Science*, 209(4458), 836–837.
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., & Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21(4), 741–751. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80591-7](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80591-7)
- Steward, O., & Worley, P. F. (2001). A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7062–7068. <http://doi.org/10.1073/pnas.131146398>
- Strekalova, T., Zörner, B., Zacher, C., Sadovska, G., Herdegen, T., & Gass, P. (2003). Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes, Brain and Behavior*, 2(1), 3–10.
- Stripling, R., Volman, S. F., & Clayton, D. F. (1997). Response modulation in the zebra finch neostriatum: relationship to nuclear gene regulation. *The Journal of Neuroscience*, 17(10), 3883–3893.
- Sugita, S., Uchimura, N., Jiang, Z. G., & North, R. A. (1991). Distinct muscarinic receptors inhibit release of gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2608–2611.
- Surmeier, D. J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., & Shen, W. (2007). D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in Neurosciences*, 30(5), 228–235. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.008>
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Szapiro, G., Barros, D. M., Ardenghi, P., Vianna, M. R., Choi, H., Silva, T., ... Izquierdo, I. (2001). Facilitation and inhibition of retrieval in two aversive tasks in rats by intrahippocampal infusion of agonists of specific glutamate metabotropic receptor subtypes. *Psychopharmacology*, 156(4), 397–401.
- Szapiro, G., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D., Paratcha, G., Ardenghi, P., ... Izquierdo, I. (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99(1), 1–5. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00236-0](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00236-0)
- Szapiro, G., Vianna, M. R. M., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, 13(1), 53–58. <http://doi.org/10.1002/hipo.10043>
- Teber, I., Köhling, R., Speckmann, E.-J., Barnekow, A., & Kremerskothen, J. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor stimulation induces expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC). *Brain Research. Molecular Brain Research*, 121(1-2), 131–136. <http://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.11.017>
- Tepper, J. M., Abercrombie, E. D., & Bolam, J. P. (2007). Basal ganglia macrocircuits. In E. D. A. and J. P. B.

- James M. Tepper (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 160, pp. 3–7). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612306600010>
- Tepper, J. M., Koós, T., & Wilson, C. J. (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends in Neurosciences*, 27(11), 662–669. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.007>
- Thiel, G., Schoch, S., & Petersohn, D. (1994). Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor zif268/egr-1. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15294–15301.
- Thomas, K. L., Hall, J., & Everitt, B. J. (2002). Cellular imaging with zif268 expression in the rat nucleus accumbens and frontal cortex further dissociates the neural pathways activated following the retrieval of contextual and cued fear memory. *European Journal of Neuroscience*, 16(9), 1789–1796. <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02247.x>
- Thompson, C. L., Pathak, S. D., Jeromin, A., Ng, L. L., MacPherson, C. R., Mortrud, M. T., ... Lein, E. S. (2008). Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron*, 60(6), 1010–1021. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.008>
- Trejo, J., & Brown, J. H. (1991). c-fos and c-jun are induced by muscarinic receptor activation of protein kinase C but are differentially regulated by intracellular calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 266(12), 7876–7882.
- Tremere, L. A. (2011). Noradrenergic modulation of light-driven egr-1 expression in the adult visual cortex. *Journal of Experimental Neuroscience*, 5, 13–19.
- Tronson, N. C., Schrick, C., Fischer, A., Sananbenesi, F., Pagès, G., Pouysségur, J., & Radulovic, J. (2007). Regulatory mechanisms of fear extinction and depression-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 33(7), 1570–1583. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301550>
- Tronson, N. C., Schrick, C., Guzman, Y. F., Huh, K. H., Srivastava, D. P., Penzes, P., ... Radulovic, J. (2009). Segregated populations of hippocampal principal CA1 neurons mediating conditioning and extinction of contextual fear. *The Journal of Neuroscience*, 29(11), 3387–3394. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5619-08.2009>
- Tronson, N. C., Wiseman, S. L., Olausson, P., & Taylor, J. R. (2006). Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nature Neuroscience*, 9(2), 167–169. <http://doi.org/10.1038/nn1628>
- Tulving, E., & Thomson, D. M. (1973). Encoding specificity and retrieval processes in episodic memory. *Psychological Review*, 80(5), 352–373. <http://doi.org/10.1037/h0020071>
- VanElzakker, M. B., Zoladz, P. R., Thompson, V. M., Park, C. R., Halonen, J. D., Spencer, R. L., & Diamond, D. M. (2011). Influence of pre-training predator stress on the expression of c-fos mRNA in the hippocampus, amygdala, and striatum following long-term spatial memory retrieval. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 30. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00030>
- Van Rossum, D., & Hanisch, U. K. (1999). Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? *Trends in Neurosciences*, 22(7), 290–295.
- Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Worley, P. F., & Guzowski, J. F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(23), 10067–10071.
- Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T. K., Rosi, S., Chowdhury, S., ... Barnes, C. A. (2006). Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(3), 317–329. <http://doi.org/10.1002/cne.21003>
- Vianna, M. R., Barros, D. M., Silva, T., Choi, H., Madche, C., Rodrigues, C., ... Izquierdo, I. (2000). Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology*, 150(1), 77–84.
- Vianna, M. R., Igaz, L. M., Coitinho, A. S., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79(3), 199–203. [http://doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00003-0](http://doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00003-0)
- Vianna, M. R., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12251–12254. <http://doi.org/10.1073/pnas.211433298>
- Villarréal, J. S., & Barea-Rodríguez, E. J. (2006). ERK phosphorylation is required for retention of trace fear

- memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(1), 44–57. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.08.005>
- Von der Kammer, H., Mayhaus, M., Albrecht, C., Enderich, J., Wegner, M., & Nitsch, R. M. (1998). Muscarinic acetylcholine receptors activate expression of the EGR gene family of transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(23), 14538–14544.
- Von Herten, L. S. J., & Giese, K. P. (2005). Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *The Journal of Neuroscience*, 25(8), 1935–1942. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-04.2005>
- Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, J., Staubli, U., Kauselmann, G., ... Kuhl, D. (2001). Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca<sup>2+</sup> and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *The Journal of Neuroscience*, 21(15), 5484–5493.
- Wang, H., Hu, Y., & Tsien, J. Z. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology*, 79(3), 123–135. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.004>
- Wang, S.-Z., Hu, J., Long, R. M., Pou, W. S., Forray, C., & El-Fakahany, E. E. (1990). Agonist-induced down-regulation of m1 muscarinic receptors and reduction of their mRNA level in a transfected cell line. *FEBS Letters*, 276(1–2), 185–188. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80538-T](http://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80538-T)
- Wang, Y., Zheng, F., Zhou, X., Sun, Z., & Wang, H. (2009). Converging signal on ERK1/2 activity regulates group I mGluR-mediated Arc transcription. *Neuroscience Letters*, 460(1), 36–40. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.023>
- Wickelgren, W. A., Corbett, A. T., & Doshier, B. A. (1980). Priming and retrieval from short-term memory: A speed accuracy trade-off analysis. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 19(4), 387–404. [http://doi.org/10.1016/S0022-5371\(80\)90276-5](http://doi.org/10.1016/S0022-5371(80)90276-5)
- Winters, B. D., Tucci, M. C., & DaCosta-Furtado, M. (2009). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(9), 545–553. <http://doi.org/10.1101/lm.1509909>
- Wisden, W., Errington, M. L., Williams, S., Dunnett, S. B., Waters, C., Hitchcock, D., ... Hunt, S. P. (1990). Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron*, 4(4), 603–614.
- Worley, P. F., Bhat, R. V., Baraban, J. M., Erickson, C. A., McNaughton, B. L., & Barnes, C. A. (1993). Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(11), 4776–4786.
- Xiao, B., Cheng Tu, J., & Worley, P. F. (2000). Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3), 370–374. [http://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00087-8](http://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00087-8)
- Yamasaki, Y., Hashikawa, K., Matsuki, N., & Nomura, H. (2012). Off-line Arc transcription in active ensembles during fear memory retrieval. *European Journal of Neuroscience*, 36(10), 3451–3457.
- Yang, Y.-L., Chao, P.-K., & Lu, K.-T. (2005). Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, 31(5), 912–924. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300899>
- Ying, S.-W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M. J., Hunt, S. P., Bliss, T. V. P., & Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *The Journal of Neuroscience*, 22(5), 1532–1540.
- Yin, H. H., & Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 464–476. <http://doi.org/10.1038/nrn1919>
- Yin, H. H., Mulcare, S. P., Hilário, M. R. F., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M. I., ... Costa, R. M. (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature Neuroscience*, 12(3), 333–341. <http://doi.org/10.1038/nn.2261>
- Yin, H. H., Ostlund, S. B., & Balleine, B. W. (2008). Reward-guided learning beyond dopamine in the nucleus accumbens: the integrative functions of cortico-basal ganglia networks. *The European Journal of Neuroscience*, 28(8), 1437–1448. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06422.x>
- Yin, H. H., Ostlund, S. B., Knowlton, B. J., & Balleine, B. W. (2005). The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, 22(2), 513–523. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04218.x>
- Zangenehpour, S., & Chaudhuri, A. (2002). Differential induction and decay curves of c-fos and zif268



revealed through dual activity maps. *Molecular Brain Research*, 109(1–2), 221–225. [http://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00556-9](http://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00556-9)

Zangenehpour, S., & Chaudhuri, A. (2005). Patchy organization and asymmetric distribution of the neural correlates of face processing in monkey inferotemporal cortex. *Current Biology*, 15(11), 993–1005. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.031>

Zhou, F.-M., Wilson, C. J., & Dani, J. A. (2002). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 590–605. <http://doi.org/10.1002/neu.10150>

# 13 ANEXO: ARTÍCULO PUBLICADO.

Behavioural Brain Research 287 (2015) 8–14



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)



Research report

## Protein synthesis is not required for acquisition, consolidation, and extinction of high foot-shock active avoidance training



Sofía González-Salinas, Andrea C. Medina, Vera Marín-Vignando, Cloy X. Ruiz-López, Gina L. Quirarte, Roberto A. Prado-Alcalá\*

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

### HIGHLIGHTS

- Cycloheximide did not hinder acquisition of low- and high-intensity active avoidance training.
- Cycloheximide impairs consolidation and extinction of low-intensity training.
- High-intensity training protects consolidation from cycloheximide impairing effects.
- High-intensity training protects extinction from cycloheximide impairing effects hinder.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 December 2014

Received in revised form 11 March 2015

Accepted 16 March 2015

Available online 23 March 2015

#### Keywords:

Cycloheximide

Aversive learning

Enhanced training

Overtraining

Long-term memory

Extinction

Rat

### ABSTRACT

Long-term memory of active avoidance in mice is not disturbed by administration of protein synthesis inhibitors (PSIs) when relatively high levels of training are used, whereas a detrimental effect is produced with lower levels of training. PSIs also disrupt extinction of avoidance behaviors in rodents, but it is not clear whether PSIs also affect this form of learning when the behavior to be extinguished was produced by a high level of training. Experiment 1 demonstrated that rats treated with the PSI cycloheximide (CXM) 30 min before training developed normal acquisition after training with either high or low foot-shock stimulation, but that memory consolidation was hindered only after low foot-shock training. Experiment 2 demonstrated that CXM disrupted extinction when administered before the first of a series of extinction sessions when low foot-shock intensity was used during training; in contrast, after training with a higher foot-shock, the PSI treatment only interfered transiently with extinction. These results indicate that acquisition, consolidation, and extinction of active avoidance learning produced by high aversive stimulation are not dependent on protein synthesis and that these processes are governed by mechanisms different from those underlying moderate forms of learning.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The common finding that systemic and intracerebral administration of protein synthesis inhibitors (PSIs) around the time of training impedes the formation of long-term memory, presumably by interfering with the process of consolidation, has led to the notion that this process is dependent on de novo protein synthesis [1–6]. There are instances, however, in which PSIs do not disturb consolidation, for example, when mice are given relatively

high numbers of trials of active avoidance training [7]. This result is consistent with those showing that interference with brain activity, produced by a variety of treatments, hinders memory consolidation, but they become ineffective when animals are subjected to enhanced training in diverse learning tasks (for a review see [8]).

Divergent results have also been reported regarding the effects of PSIs on extinction, a form of learning in which subjects decrease the intensity or frequency of responses to a cue that no longer predicts a consequence [9,10]. In many studies, PSIs have been found to interfere with extinction [11–21], although it has also been reported that PSIs facilitate [18,22] or have no effect [23,24] on this type of learning.

It has been found that PSIs facilitate extinction when the strength of the original trace is high; in contrast, if the trace is weak, then extinction is blocked [25].

\* Corresponding author at: Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001 Querétaro, Qro 76230, Mexico. Tel.: +55 442 238 1047.

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

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.031>

0166-4328/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

These results are consistent with experiments in which the effects of PSIs were assessed by varying either the time of exposure to the context in which the original learning took place or the number of original training and extinction sessions [17,20,26].

However, it is difficult to figure out which of these variables is more important in explaining the differential effects of PSIs on consolidation and extinction. In the present work, we administered a PSI to rats that were trained in active avoidance, controlling for the time factor by giving a constant number of trials during training and during extinction sessions, varying only the intensity of the unconditioned stimulus used during training.

The aim of the present experimental series was two-fold: (a) to compare the effects of a PSI on acquisition and consolidation of active avoidance trained with low and high foot-shock intensities in rats, in order to extend previous findings showing that PSIs do not interfere with memory of active avoidance in mice [27] and (b) to evaluate the effects of cycloheximide (CXM) on the development of extinction of this task in rats trained with low and high foot-shock intensities.

## 2. Material and methods

All the experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México and complied with the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [28].

### 2.1. Animals

We used male Wistar rats (250–350 g) that were maintained in a room with a 12 h/12 h light–dark cycle (lights on at 7:00 h) and housed individually in acrylic cages with food and tap water *ad libitum*; all behavioral observations were carried out between 8:00 a.m. and 1:00 p.m. Each rat was randomly assigned to one of the experimental or control groups; the sample size ranged from 10 to 13 rats per group.

### 2.2. Apparatus

The apparatus is an alley with two distinct compartments of the same size (30 × 30 × 30 cm), separated by a guillotine door. The safe compartment had all walls and lid of red-colored acrylic with a floor of stainless steel bars (6 mm in diameter, separated by 9 mm); a 10 W light bulb located in the center of its lid illuminated it. The non-illuminated shock compartment had front and back walls and floor made of stainless steel plates, with side walls and lid constructed of red-colored acrylic. The walls and floor were shaped like a trough: 20 cm wide at the top and 8 cm wide at the bottom. In the middle of the floor, a 1.5 cm slot separated the two stainless steel plates that make up the walls and floor. In this compartment, the rats were in contact with both plates through which foot-shock could be delivered. The apparatus was cleansed with 10% alcohol before and after each rat occupied it. A square-pulse stimulator (Grass model S-48), in series with a constant current unit (Grass model CCU-1), generated the foot-shock. Shock delivery and measurement of latencies to cross from one compartment to the other were accomplished using an all-purpose programmable logic smart relay module (Schneider Electric model SR3B101FU). The apparatus was located inside a dark, sound-proof room provided with background masking noise.

### 2.3. Handling

Before the behavioral experiments began, the experimenter handled each animal. This consisted of gently touching and holding

the rat with both hands, using gloves, for approximately 5 min for 3 consecutive days.

### 2.4. One-way active avoidance training

The training and testing procedures have been described in detail elsewhere [29]. Briefly, during each of the 20 training trials, the animal was introduced into the shock compartment of the two-compartment box, and the guillotine door dividing the compartments was opened. If the rat crossed to the safe compartment in 10 s or less, an avoidance response was scored, and the door was closed; if the rat did not cross to the safe compartment within 10 s, the stimulator was turned on and remained on until the animal escaped to the safe compartment and then the door was closed (foot-shock intensities will be specified subsequently). The rat was left in the safe compartment for 30 s, and a new trial was initiated by returning it to the shock compartment.

### 2.5. Extinction protocol

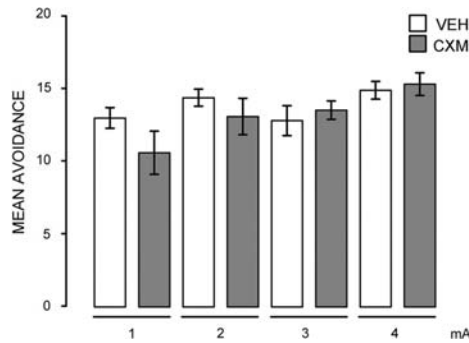
Forty-eight hours after active avoidance training, animals were subjected to either one (Experiment 1) or to three or four (Experiment 2) extinction sessions of 20 trials each; in the latter case, the sessions were spaced 48 h apart. The same procedure as in training was followed, but the foot-shock was omitted. Again, an avoidance response was scored if the animal crossed to the safe compartment with a latency of 10 s or less. In Experiment 1, a maximum of 20 rats were trained on a particular day, randomly assigned to one of the intensities and pharmacological treatments. In Experiment 2, we first explored the effects of the injections performed before the first extinction trial and then we studied the effects of the injections administered before the second or third extinction trials. As in Experiment 1, a maximum of 20 rats were studied on a particular day, randomly assigned to one of the intensities and pharmacological treatments.

### 2.6. Pharmacological treatments

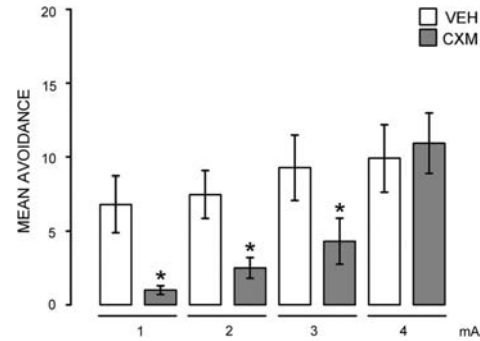
The rats received a subcutaneous injection of cycloheximide (CXM, 2.8 mg/kg, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or VEH (1% DMSO, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, in isotonic saline). This dose of CXM was chosen because it has been shown to produce amnesia of avoidance learning in rats [30–32]. In all the experiments, CXM or VEH was administered 30 min before the indicated session, because 2.8 mg/kg of CXM produces the maximum degree of inhibition of protein synthesis in the brain (about 70%) at this time in naive rats [30], and this degree of inhibition remains the same in rats that had been administered 2.0 [30] and 4.0 mA [33].

### 2.7. Statistical analyses

The data presented in the figures represent means ± standard error of the means. In Experiment 1, a two-way ANOVA was used to assess the differences in active avoidance responses between groups receiving different foot-shock intensities (1.0, 2.0, 3.0, and 4.0 mA) and treatments (CXM and VEH). In Experiment 2, we used a repeated-measures three-way ANOVA to assess the differences in active avoidance responses between foot-shock intensities (2.0 and 4.0 mA), treatments (CXM and VEH), and sessions (training and extinction), with repeated measures on the third factor. The ANOVAs were followed, when appropriate, by Fisher's Least Significant tests.



**Fig. 1.** Mean number of avoidance responses ( $\pm$ SEM) during the training session displayed by groups of rats treated with vehicle solution (VEH) or cycloheximide (CXM) 30 min before training with 1.0, 2.0, 3.0, or 4.0 mA. There were no significant differences between VEH and CXM groups at any of the intensity levels.



**Fig. 2.** Mean number of avoidance responses ( $\pm$ SEM) during the retention session displayed by groups of rats trained with 1.0, 2.0, 3.0, or 4.0 mA and treated 30 min before training with the vehicle solution (VEH) or with cycloheximide (CXM). CXM produced a significant retention deficit when the lower foot-shock intensities were used for training, but it was innocuous when the higher intensity was used.

### 3. Experiment 1

#### 3.1. Acquisition and consolidation

Multiple-trial training impedes the amnesic effect of PSIs in active avoidance learning in mice [7]. It was of interest, therefore, to determine whether this lack of effect of PSIs on memory consolidation of active avoidance could be expanded to also include a condition in which stronger training is produced by high foot-shock stimulation in the rat. This experiment was also important, in that it would allow us to determine the appropriate parameters of training to be used in the second experiment of this series. It should be mentioned that a short-lived amnesic state for active avoidance was previously found in the rat after treatment with a PSI; however, only one, relatively low, level of foot-shock was used [34].

##### 3.1.1. Experimental design

Independent groups of rats received one of four different foot-shock intensities during training (1.0, 2.0, 3.0, or 4.0 mA). CXM or VEH was administered 30 min before the training session. We shall refer to the single extinction session of this experiment, run 48 h after training, as the retention session, to differentiate it from the extinction sessions of Experiment 2.

##### 3.1.2. Results

**3.1.2.1. General behavior.** We found increased salivation after the injection of CXM, which did not last for more than 10 min; also less than 15% of the treated rats showed short-lived diarrhea. We measured spontaneous motor activity in a VersaMax Animal Activity Monitoring System (AccuScan Instruments, Inc.) at 30 min and 48 h after injection of CXM or VEH ( $n = 10$  rats per group). There were no significant differences between the groups (data not shown).

**3.1.2.2. Training session.** The data obtained from the training session indicated a significant difference in avoidance responses due to the main effect of foot-shock intensity ( $F(3, 84) = 4.69$ ,  $p = 0.005$ ). Significant differences were found only in the 1.0 mA CXM group, with fewer avoidance responses, when compared with the 3.0 and 4.0 mA groups that had been treated with CXM ( $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively) (Fig. 1). No significant differences were produced by the treatment ( $F(1, 84) = 1.01$ ,  $p = 0.27$ ), nor was there a significant interaction between these two variables ( $F(3, 84) = 1.35$ ,  $p = 0.27$ ) (Fig. 1).

**3.1.2.3. Retention session.** The results of the retention session point to a significant difference due to the main effect of foot-shock intensity ( $F(3, 84) = 5.22$ ,  $p = 0.002$ ). Although no differences were found among the VEH groups across the four foot-shock intensities, the 4.0 mA CXM group had more avoidance responses than the other CXM groups ( $p < 0.01$  for each comparison) (Fig. 2).

Also significant was the main effect of treatments ( $F(1, 84) = 8.69$ ,  $p = 0.004$ ). There were significantly lower avoidance scores in the CXM groups when compared with their respective VEH control groups trained with 1.0, 2.0, and 3.0 mA ( $p < 0.05$  for each comparison). In contrast, the CXM and VEH groups trained with 4.0 mA did not differ from each other (Fig. 2). The interaction of foot-shock intensity and treatments was not significant ( $F(3, 84) = 1.59$ ,  $p = 0.20$ ).

#### 3.2. State dependency

Because the CXM was administered before training, and retention was measured 48 h afterwards, it might be argued that the detrimental effects on performance were due to a state-dependent effect and not to disturbance of memory processes. Therefore, we investigated the effects of CXM injected before training and again before the retention test. Two groups of rats were trained with 1.0 mA. They received two injections of either VEH (group VEH–VEH) or CXM (group CXM–CXM): one at 30 min before training and the other 30 min before the test of retention.

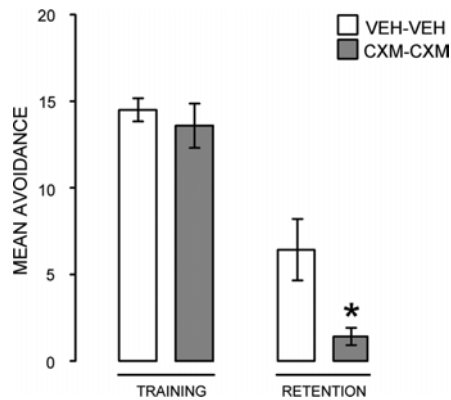
##### 3.2.1. Results

The two-way ANOVA revealed a significant main treatment effect ( $F(1, 24) = 5.93$ ,  $p = 0.023$ ). When compared with the VEH–VEH group, the performance of the CXM–CXM group was poorer only on the retention test ( $p < 0.01$ ). There was also a main session effect ( $F(1, 24) = 71.32$ ,  $p < 0.0001$ ); both groups showed significantly higher avoidance on the training session than in the retention session ( $p < 0.01$ ) (Fig. 3). The interaction of treatment and sessions was not significant ( $F(1, 24) = 2.92$ ,  $p = 0.10$ ). These results indicate that the deficits observed are not due to state dependency.

### 4. Experiment 2

#### 4.1. Administration of CXM before the extinction sessions

If the hypothesis that protein synthesis is essential for memory of extinction learning is correct [12,14–16], then protein synthesis inhibition should impede this process, regardless of the animal



**Fig. 3.** Mean number of avoidance responses ( $\pm$ SEM) of groups of rats trained with 1.0 mA and injected 30 min before training and again 30 min before retention testing with either vehicle solution (VEH-VEH) or cycloheximide (CXM-CXM). Cycloheximide did not interfere with acquisition, as avoidance performance during training did not differ significantly from that of the vehicle group. The CXM-CXM group showed a significant retention deficit, which indicates that the poor performance was not due to state dependency. \* $p < 0.01$  relative to VEH-VEH.

species under study or of the training conditions that established the behavior to be extinguished. If, in contrast, extinction occurs in spite of protein synthesis inhibition, then the generality of the hypothesis that protein synthesis is required would not be supported, and alternative hypotheses should be considered.

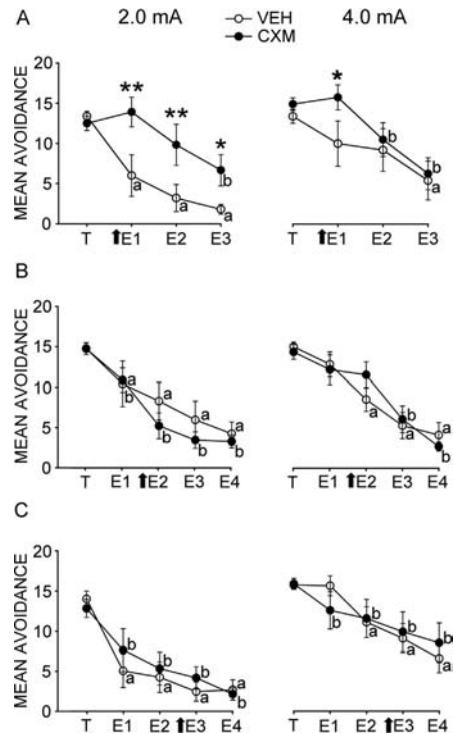
As mentioned earlier, it has also been hypothesized that the effects of PSIs on extinction depend on the strength of the original learning [17,18,20,25,35]. If this hypothesis were correct, then one would expect extinction to be retarded or facilitated by administering CXM to rats that had been trained in active avoidance with low or high foot-shock intensities, respectively.

#### 4.1.1. Experimental design

Animals were trained with either 2.0 or 4.0 mA because in Experiment 1, the former intensity was 1 U above the lowest intensity where amnesia was produced, and the latter impeded the amnesic effect of CXM. Rats received one subcutaneous injection of CXM or VEH, 30 min before the first, second, or third extinction sessions. Animals that received the treatment before the first extinction session were evaluated for a total of three sessions. After analyzing the results, we deemed important to extend the number of tests to better observe the extinction process; thus, animals that received the drug before the second or third session were tested for a total of four sessions.

#### 4.1.2. Injections before the first extinction session

**4.1.2.1. Results.** There was a no significant main effect of foot-shock intensity ( $F(1, 40) = 3.03, p = 0.09$ ). In contrast, we found a significant main effect of treatments ( $F(1, 40) = 7.21, p = 0.01$ ), indicating that the CXM groups had higher avoidance responses than the VEH groups. A main effect of sessions also became evident ( $F(3, 120) = 26.29, p = 0.0001$ ); all of the groups showed extinction. The only significant interaction was that between treatments and sessions, showing that the treatment affected the progression of extinction ( $F(3, 120) = 3.45, p = 0.02$ ). The post hoc test showed that when the low foot-shock was used in training, the CXM group had higher avoidance scores than the VEH group in each of the three extinction sessions ( $p < 0.01, < 0.01, \text{ and } < 0.05$ , respectively), as shown in Fig. 4A. When 4.0 mA was used for training, there was a significant difference between the groups in the first extinction



**Fig. 4.** Avoidance responses during training (T) and extinction (E) sessions displayed by groups of rats that were trained with 2.0 or 4.0 mA and treated with vehicle solution (VEH) or cycloheximide (CXM) at 30 min before E1, E2, or E3, as indicated by the arrows in panels A, B, and C, respectively. \* $p < 0.05$  vs. VEH; \*\* $p < 0.001$  vs. VEH; a,  $p < 0.05$  vs. T (VEH groups); b,  $p < 0.05$  vs. T (CXM groups).

session ( $p < 0.01$ ), but not in the subsequent two sessions. Regarding the 2.0 mA groups, extinction was evident in the VEH group in the three extinction sessions ( $p < 0.01$ , training session vs. each of the three extinction sessions). In contrast, it was not until the last session that signs of extinction appeared in the CXM group ( $p = 0.01$ , training vs. third extinction session). When the 4.0 mA foot-shock was used for training, extinction was established by the second session ( $p < 0.05$  vs. training session) and was maintained on the third session ( $p < 0.01$  vs. training session) in the CXM group; in the VEH group, extinction became evident by the third session ( $p < 0.01$  vs. training session) (Fig. 4A).

Once we had found that administering CXM shortly before the first exposure to the extinction procedure significantly interfered with extinction in the low foot-shock condition, we then investigated whether this inhibitor would produce a similar effect after one or two sessions of extinction. To this end, we injected CXM before either the second or third extinction session. Essentially, the same outcome was found in both conditions, as described subsequently.

#### 4.1.3. Injections before the second extinction session

**4.1.3.1. Results.** There were no significant main effects of foot-shock intensity ( $F(1, 42) = 1.37, p = 0.249$ ) or of treatments ( $F(1, 42) = 0.22, p = 0.64$ ). Only a main effect of sessions was found ( $F(4, 168) = 76.10, p = 0.0001$ ). The VEH and CXM groups trained with 2.0 mA showed fewer avoidance responses in each of the extinction sessions relative to the training session ( $p < 0.05$  for each

comparison). When 4.0 mA was used for training, extinction was evident starting on the second and third extinction sessions in the VEH and CXM groups, respectively ( $p < 0.001$  vs. training session) (Fig. 4B). None of the interactions reached statistical significance.

#### 4.1.4. Injections before the third extinction session

**4.1.4.1. Results.** We found significant main effects of foot-shock intensity ( $F(1, 33) = 19.79, p < 0.0001$ ), revealing that the groups trained with 4.0 mA had higher mean avoidance scores than those of the 2.0 mA trained groups (Fig. 4C). There were no main treatment effects ( $F(1, 33) = 0.10, p = 0.75$ ), but a main effect of sessions was found ( $F(4, 132) = 53.97, p = 0.0001$ ), demonstrating that extinction was accomplished by all of the groups. Only the interaction between intensities and sessions was statistically significant ( $F(4, 132) = 3.92, p = 0.005$ ). Although there were no significant differences between the VEH and CXM groups that had been trained with 2.0 or 4.0 mA, the VEH group trained with 4.0 mA had a significantly higher mean number of avoidance responses than the one trained with 2.0 mA in each of the four extinction sessions ( $p < 0.01$  for each comparison). The same was true for the CXM groups, that is, a higher mean number of avoidance responses in the animals trained with 4.0 mA ( $p < 0.01$  for each comparison). Moreover, the VEH and CXM groups trained with 2.0 mA showed fewer avoidance responses in each of the extinction sessions relative to the training session ( $p < 0.01$  for each comparison). The VEH group trained with 4.0 mA showed fewer avoidance responses in the second, third, and fourth extinction sessions, relative to the training session ( $p < 0.01$  for each comparison). The same was true for the 4.0 mA CXM group, and, additionally, it showed fewer avoidance responses in the first extinction session ( $p < 0.05$ ).

## 5. Discussion

The main findings provided by the present work were that when animals are trained with a relatively high intensity of foot-shock, acquisition and consolidation of active avoidance learning are unaffected by protein synthesis inhibition and that protein synthesis inhibition produces a transient deficit on extinction.

Experiment 1 showed that, regardless of foot-shock intensity used for training of active avoidance, pre-training CXM did not interfere with acquisition of this task (Fig. 1), suggesting that this process is independent of *de novo* protein synthesis, as earlier proposed for this task and for other positively and negatively reinforced tasks as well [2]. We also found that CXM did impair consolidation in those groups trained with relatively low foot-shock intensities, confirming the amnesic effects of PSIs (for reviews see [1–3,5,6]). The same treatment, however, did not impair consolidation when a higher foot-shock was used (Fig. 2). This result agrees well with the early works of Flood et al. [7] and Barondes and Cohen [36] in mice trained in active avoidance and with that of Díaz-Trujillo et al. [30] in rats, in which pre- and post-training administration of CXM produced amnesia of inhibitory avoidance training with low foot-shocks, but not when higher foot-shocks were used.

The significant impairment in retention performance produced by CXM may be interpreted in at least two ways: first, that CXM impaired the consolidation process and, secondly, that pre-training CXM produced state-dependent learning for the reason that during training, the animals were under the pharmacological effects of the drug whereas the test of retention occurred in a non-drugged state. This ambiguity was resolved because CXM also produced amnesia when it was administered 30 min before training and again 30 min before retention testing (Fig. 3), thus favoring the first interpretation. It is worth pointing out that as in the case just described of a single injection of CXM before training in Experiment 1 (Fig. 1),

CXM did not interfere with acquisition of the task (Fig. 3); also, the mean retention scores of the VEH–VEH (mean score 6.4) and CXM–CXM (mean score 1.4) groups (Fig. 3) were practically the same as those of the VEH (mean score 6.8) and CXM (mean score 1.0) groups (Fig. 2). These results reflect the reliability of our experimental procedures.

The commonly held view that protein synthesis is a requisite for memory consolidation [1,2,37] was not supported by the present findings as no disturbances in this process were observed after training with the higher foot-shock level. Because learning and consolidation took place in the presence of CXM, we conclude that protein synthesis was not involved in these processes. Alternative interpretations will be discussed subsequently.

Regarding the effects of CXM on extinction, the results showed that all of the groups attained extinction, independently of foot-shock intensity administered during active avoidance training and of the treatment administered before the tests of extinction. However, CXM had different effects on the rate of extinction, depending on the order of its administration and the foot-shock intensity used during training. When injected before the first extinction session, CXM significantly slowed down the development of this response in the animals trained with the low foot-shock (Fig. 4A). It seems unlikely that the slowing down of the extinction process was due simply to some type of interference with performance of the task; if such were the case, then a performance deficit should have been evident in all of the extinction groups treated with CXM, regardless of time of injection; no such deficit was seen when the CXM was administered before the second or third extinction sessions. An additional argument against the possibility that CXM produced a performance deficit is the fact that, in Experiment 1, this treatment did not interfere with acquisition of the avoidance response at any of the foot-shock intensity levels. Furthermore, there were no significant differences in spontaneous motor activity between CXM- and VEH-treated rats.

The finding that a single administration of the protein synthesis inhibitor just before the initiation of the extinction procedure hindered the development of extinction in the low foot-shock group (Fig. 4A) is consistent with the report by Cammarota et al. [13]. They found that a single injection of the PSI anisomycin into the hippocampus before the first of a series of extinction sessions induced a sustained deficit in the extinction of inhibitory avoidance. These results draw attention to the importance, for this new learning, of intact associative processing, which must be present during the initial exposure to the extinction experience. We also found that when the low foot-shock groups were injected with CXM before the second or third extinction session, extinction evolved normally, as shown by the absence of any behavioral effect of CXM in these groups. This phenomenon had already been described in the report cited earlier [13]; intrahippocampal infusion of anisomycin 15 min before the third non-reinforced session did not interrupt the progression of extinction in subsequent sessions. These data indicate that once non-reinforcement is experienced, as happened on the sessions prior to the administration of treatments, extinction learning ensues in spite of subsequent interference with protein synthesis, or with whatever activity was altered by the PSI.

At variance with our results are those published by Berman and Dudai [11], who found that a single administration of a PSI before the first of three non-reinforced test sessions produced a short-lived impediment of extinction, which was evident only in the second session; in the third session, clear extinction was observed.

Besides obvious differences in the mode of PSI administration in the studies by Berman and Dudai [11], Cammarota et al. [13], and in the present work (local infusion into the insular cortex, hippocampus, and systemic administration, respectively), differences in training are noteworthy. Whereas Berman and Dudai [11] used conditioned taste aversion, a classical conditioning task, a

two-factor model of conditioning was implemented in the other two studies, namely, association of the context (CS) with a foot-shock (UCS) and negatively reinforced instrumental learning in the inhibitory and active avoidance tasks. These procedural differences probably account for the dissimilar effects of PSIs on the development of extinction learning.

The finding that administration of CXM to the low foot-shock group just before the extinction procedure was initiated, produced disruption of this new learning in all of the extinction sessions, suggests that de novo protein synthesis underlies memory of extinction learning, as pointed out before by many authors [11,13,15,19,38]. This interpretation must be taken cautiously, however, because a similar disruption should have been produced by CXM after training with the higher foot-shock, but this was not the case. Extinction was achieved, although at a slower pace, by the CXM group trained with the higher foot-shock. Furthermore, extinction learning was undisturbed in the rest of the CXM groups, regardless of foot-shock intensity or time of injection.

Our finding that CXM had only a transitory effect on extinction of enhanced active avoidance in the rat agrees well with results related to consolidation of inhibitory avoidance, in which CXM failed to disrupt memory consolidation of intense inhibitory avoidance training [30]. Consistent with the findings that PSIs do not produce reliable effects on memory consolidation, and contrary to what would be expected if protein synthesis were a requisite for memory consolidation, it was recently reported that a high dose of CXM was ineffective when inhibitory avoidance training was mediated by relatively low-intensity foot-shocks, but it impaired memory when foot-shocks of higher intensity were administered; moreover, a low dose of CXM improved memory [39].

We propose that training with a relatively high foot-shock intensity protects memory from the interfering effects of PSIs on brain activity produced not only by the inhibition of de novo protein synthesis but also by the concomitant, non-specific effects of PSIs [3,5,6], including massive release of norepinephrine, serotonin, dopamine, and acetylcholine [40,41] and suppression of neural activity [42].

A number of alternatives to protein synthesis have been proposed as mechanisms underlying memory processes. Examples include post-translational modification of proteins already at the synapse [6] and those highlighted by Lattal and Abel [23]; alterations in the neuronal cytoskeleton [43,44], autophosphorylation of protein kinases [45], and proteolysis [46].

Even though we are far from understanding the mechanisms underlying the protective effect of enhanced training against typical amnesic agents, seen in a wide variety of behavioral tasks [8], a growing body of literature supports the idea that amnesic agents exert their disruptive effects when new information is being updated [47–49]; thus, initial extinction trials serve as a novel piece of information for an organism that has received relatively consistent reinforcement. When CHX was administered prior to the first set of extinction trials, it produced an amnesic effect when low intensity was used for training (i.e., when the previous shock reinforcement memory was being updated to an extinction memory). However, when CHX was administered prior to the second or third set of extinction trials, it was not effective. According to the updating consolidation theory, the lack of an amnesic effect was due to the absence of novel information during the second and third extinction sessions (i.e., rats already had some form of an extinction trace). More difficult to interpret, however, is the lessened disruptive effect of CXM administration before the first extinction session of high-intensity trained animals. In theory, they were also experiencing updating, and one would have expected CXM to disrupt this new learning, but such was not the case.

In sum, our results indicate that different, still unknown, neurobiological mechanisms underlie memory consolidation and

extinction of active avoidance trained with relatively low and high levels of aversive stimulation.

## 6. Conclusions

CXM did not interfere with normal acquisition of active avoidance learning trained with either high or low foot-shock stimulation, whereas memory consolidation was hindered only after low foot-shock training. In a similar way, CXM disrupted extinction when low foot-shock intensity was used during training; however, CXM was ineffective after training with a higher foot-shock. These results indicate that training with different intensities of aversive stimulation induces memory traces of dissimilar strength, in such a way that weaker traces are sensitive to the disruptive effects of protein synthesis inhibitors on consolidation and extinction, whereas stronger traces are resistant to such disruptive effects.

## Acknowledgments

The authors thank A. Méndez, N. Serafin, O. González, M. García, and E. Pinzón for their excellent technical assistance and Dr Dorothy Pless for reviewing and proofreading the manuscript. This work was supported by CONACYT (grant 128259) and PAPIIT (grant 201712). This work was carried out in partial fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) by S. González-Salinas, who was a recipient of a Graduate Scholarship from CONACYT (Becario 229335).

## References

- Alberini CM. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiol Learn Mem* 2008;89:234–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2007.08.007>.
- Davis HP, Squire LR. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 1984;96:518–59.
- Gold PE. Protein synthesis inhibition and memory: formation vs amnesia. *Neurobiol Learn Mem* 2008;89:201–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.006>.
- Hernandez PJ, Abel T. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem* 2008;89:293–311. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2007.09.010>.
- Martínez Jr JL, Jensen RA, McLaugh JL. Attenuation of experimentally-induced amnesia. *Prog Neurobiol* 1981;16:155–86.
- Routtenberg A, Rekart JL. Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends Neurosci* 2005;28:12–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.006>.
- Flood JF, Bennett EL, Orme AE, Rosenzweig MR. Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiol Behav* 1975;14:177–84.
- Prado-Alcalá RA, Medina AC, Serafin N, Quirarte GL. Intense emotional experiences and enhanced training prevent memory loss induced by post-training amnesic treatments administered to the striatum, amygdala, hippocampus or substantia nigra. *Rev Neurosci* 2012;23:501–8. <http://dx.doi.org/10.1515/revneuro-2012-0061>.
- Milad MR, Quirk GJ. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol* 2012;63:129–51. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.psych.121208.131631>.
- Pavlov IP. *Conditioned Reflexes*. Courier Dover Publications; 1927.
- Berman DE, Dudai Y. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* 2001;291:2417–9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1058165>.
- Braud WG, Broussard WJ. Effects of puromycin on memory for shuttle box extinction in goldfish and barpress extinction in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1973;1:651–6.
- Cammarota M, Bevilacqua LRM, Rossato JI, Ramirez M, Medina JH, Izquierdo I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem* 2005;84:25–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2005.03.002>.
- Cohen J, Gotthard GH. Extinction of appetitive learning is disrupted by cycloheximide and propranolol in the sand maze in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2011;95:484–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.011>.
- Flood JF, Jarvik ME, Bennett EL, Orme AE, Rosenzweig MR. Protein synthesis inhibition and memory for pole jump active avoidance and extinction. *Pharmacol Biochem Behav* 1977;7:71–7.

- [16] Gotthard GH, Knoppel AB. Cycloheximide produces amnesia for extinction and reconsolidation in an appetitive odor discrimination task in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2010;93:127–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.09.002>.
- [17] Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, et al. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci* 2009;29:402–13. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4639-08.2009>.
- [18] Power AE, Berlau DJ, McLaugh JL, Steward O. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: the role of re-exposure duration. *Learn Mem* 2006;13:27–34. <http://dx.doi.org/10.1101/jm.91206>.
- [19] Santini E, Ge H, Ren K, Peña de Ortiz S, Quirk GJ. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 2004;24:5704–10. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0786-04.2004>.
- [20] Sandusky LA, Flint RW, McNay EC. Effects of the protein synthesis inhibitor cycloheximide on anxiety-like extinction behavior in an animal model of post-traumatic stress. *Behav Brain Res* 2012;231:208–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.019>.
- [21] Vianna MR, Igaz LM, Coitinho AS, Medina JH, Izquierdo I. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 2003;79:199–203. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7427\(03\)00003-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7427(03)00003-0).
- [22] Fischer A, Sananbenesi F, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. Distinct roles of hippocampal *de novo* protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. *J Neurosci* 2004;24:1962–6. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5112-03.2004>.
- [23] Lattal KM, Abel T. Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J Neurosci* 2001;21:5773–80.
- [24] Lattal KM, Honarvar S, Abel T. Effects of post-session injections of anisomycin on the extinction of a spatial preference and on the acquisition of a spatial reversal preference. *Behav Brain Res* 2004;153:327–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2003.12.009>.
- [25] Eisenberg M, Kobilo T, Berman DE, Dudai Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 2003;301:1102–4. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1086881>.
- [26] Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 2004;24:4787–95. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>.
- [27] Baronides SH, Cohen HD. Comparative effects of cycloheximide and puromycin on cerebral protein synthesis and consolidation of memory in mice. *Brain Res* 1967;4:44–51. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(67\)90147-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(67)90147-3).
- [28] National Research Council (US). *Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
- [29] Galindo LE, Garín-Aguilar ME, Medina AC, Serafin N, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behav Brain Res* 2008;195:153–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2008.01.011>.
- [30] Díaz-Trujillo A, Contreras J, Medina AC, Silveyra-Leon GA, Antaramian A, Quirarte GL, et al. Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the long-term memory-impairing effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. *Neurobiol Learn Mem* 2009;91:310–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.10.006>.
- [31] Squire LR, Davis HP, Spanis CW, Gold PE, Sternberg DB. Neurobiology of amnesia. *Science* 1980;209:836–7.
- [32] Milekic MH, Brown SD, Castellini C, Alberini CM. Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *J Neurosci* 2006;26:3010–20. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4818-05.2006>.
- [33] González-Salinas S. Técnicas empleadas en el estudio de la consolidación de la memoria y uso de los microarreglos para la identificación de firmas transcripcionales (B.Sc. Honors dissertation). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
- [34] Serota RG. Acetoxycycloheximide and transient amnesia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:1249–50.
- [35] Mierzejewski P, Olezak M, Rogowski A, Kostowski W, Samochowiec J, Filip M, et al. Effects of cycloheximide on extinction in an appetitively motivated operant conditioning task depend on re-exposure duration. *Neurosci Lett* 2008;441:307–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2008.06.047>.
- [36] Baronides SH, Cohen HD. Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;58:157–64.
- [37] Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 2001;294:1030–8. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067020>.
- [38] Vianna MR, Szapiro G, McLaugh JL, Medina JH, Izquierdo I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:12251–4. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.211433298>.
- [39] Gold PE, Wrenn SM. Cycloheximide impairs and enhances memory depending on dose and footshock intensity. *Behav Brain Res* 2012;233:293–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.010>.
- [40] Canal CE, Chang Q, Gold PE. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:12500–5.
- [41] Qi Z, Gold PE. Intrahippocampal infusions of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine, and acetylcholine. *Learn Mem* 2009;16:308–14. <http://dx.doi.org/10.1101/jm.1333409>.
- [42] Sharma AV, Nargang FE, Dickson CT. Neurosilence: profound suppression of neural activity following intracerebral administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin. *J Neurosci* 2012;32:2377–87. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3543-11.2012>.
- [43] Kennedy MB. The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* 1997;20:264–8.
- [44] Van Rossum D, Hanisch UK. Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? *Trends Neurosci* 1999;22:290–5.
- [45] Lisman JE. A mechanism for memory storage insensitive to molecular turnover: a bistable autophosphorylating kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:3055–7.
- [46] Lynch G, Baudry M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 1984;224:1057–63.
- [47] Rossato JI, Bevilacqua LRM, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 2007;14:36–46. <http://dx.doi.org/10.1101/jm.422607>.
- [48] Rodríguez-Ortiz CJ, García-DeLaTorre P, Benavidez E, Ballesteros MA, Bermúdez-Rattoni F. Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiol Learn Mem* 2008;89:352–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2007.10.004>.
- [49] Rodríguez-Ortiz CJ, De la Cruz V, Gutiérrez R, Bermúdez-Rattoni F. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem* 2005;12:533–7. <http://dx.doi.org/10.1101/jm.94505>.