

Tesis Doctoral

Mecanismos neurobiológicos involucrados en la persistencia de la memoria de largo término: rol de C-fos en hipocampo y corteza retrosplenial

Katche, Cynthia L.

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Katche, Cynthia L.. (2011). Mecanismos neurobiológicos involucrados en la persistencia de la memoria de largo término: rol de C-fos en hipocampo y corteza retrosplenial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Katche, Cynthia L.. "Mecanismos neurobiológicos involucrados en la persistencia de la memoria de largo término: rol de C-fos en hipocampo y corteza retrosplenial". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN LA
PERSISTENCIA DE LA MEMORIA DE LARGO TÉRMINO:
ROL DE C-FOS EN HIPOCAMPO Y CORTEZA
RETROSPLENIAL**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el

área de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Cynthia L. Katche

Director de tesis: Dr. Prof. Jorge H. Medina

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Laboratorio de Memoria. Instituto de Biología Celular y Neurociencia. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2011

A mis Abuelitos,
los quiero y los extraño mucho!!

Agradecimientos

Por dónde se empieza a agradecer...

Es tanta la gente que afortunadamente me ha acompañado estos últimos años, soportando cada una de mis “ciclotimias” en los vaivenes de la ciencia y de la vida. Así que primero que nada voy a realizar un agradecimiento general, a todas las personas que estuvieron presentes en mi vida durante esta etapa de formación, tanto profesional como personal.

A Medina, mi flamante director de doctorado, quien me ha guiado y acompañado con tanta paciencia. Con sus grandes consejos sobre la vida y su tan afilado ojo científico, su preocupación por el bienestar de quienes estamos a su cargo, por esa combinación de sabiduría y calidez. Muchas gracias por todo Jorge!

A Pedro, mi maestro, quien con tanta paciencia me enseñó la mayoría de las tareas que aprendí en el laboratorio. Quién además tantas veces supo escucharme, aconsejarme, bancarme. Cuando te fuiste pensé que no iba a sobrevivir sin vos!

A Cecil, compañera del “otro grupo”, pero ante todo una gran amiga. Compartimos tantas cosas estos años, hasta me ayudó a sacar a la luz mi faceta artística. Como extraño esas clases de pintura, nos aislábamos del mundo. Gracias Ceci por estar en todo momento. Siempre a la escucha, siempre apoyando.

A Lion, mi otro maestro. Me tome tan al pie de la letra todo lo que me enseñó, hasta la mañas! Te fuiste cuando empezaba y volviste para el final de mi tesis. De alguna manera parece que siempre hubieras estado.

A Heidi, la jefa del “otro grupo”. Con la tranquilidad que analiza las situaciones y busca soluciones prácticas para tratar de resolver los problemas, siempre con optimismo. Por esas gratas charlas de ciencia y de la vida, siempre disponible cuando necesité consejo o discutir alguna idea.

A los otros dos del “otro grupo”. A Fabri (o Patri), no me odies, sabes que es con cariño! Me ha hecho reír tantas veces hasta las lágrimas con sus fantásticas anécdotas. Levantás al lab con tu humor! A Nad, pobrecilla siempre le hincho con todo lo de las compus, mi gran salvadora! Te mudaste más cerca para abandonarnos a Ceci y a mí en las salidas de “chicas”!?

A Carolita y CeciK, las biotecnólogas quilmeñas, cómo me han sacando las papas del fuego durante el último tramo de mi doctorado, unas maravillosas aprendices. Siempre al pie del cañon. Las quiero mucho chiquis!

A Mic, Jose y Fla, las más nuevitas! La tana, buena representante de sus orígenes, además de muy activa, muy inquieta, siempre en movimiento. Y Josefa, siempre con esa sonrisa, ese optimismo para todas las cosas, a pesar de todos los males

que padecimos el año pasado. A Fla, tan capaz, tan eficiente para todo lo que se propone. Muchas gracias chicas por las correcciones de la tesis!

A los que estuvieron y ya no están. Lean, mi “hermanito” médico, te extrañé pibito! Die, tan atolondrado con todo, cuánto se nota tu ausencia! Y Andrea, cómo te perdimos! De la noche a la mañana nos abandonaste!

A Guido y Fer, son unos genios. No tengo palabras para agradecerles todo lo que me han ayudado todos estos años. Siempre bien predisuestos, poniendo tantas ganas. Es loable la iniciativa que tienen!

A Noe y a Mary, las “anexas del lab”. Muchas gracias Noe por tanta charla descarga, por escucharme y aconsejarme. Gracias a ambas por haber leído mi tesis y ayudarme con las correcciones. Son unas divinas!

A Martin e Iván, que me abrieron las puertas de su laboratorio en Brasil para realizar varios de los primeros experimentos de la tesis. Gracias por las charlas, las palabras y el apoyo.

A Lina, una genia! Ella sabe TODO. Siempre con las palabras justas. Se nota mucho los días que no estás, siempre te ocupaste de todo lo que necesitábamos.

A Paula, siempre con tan buen humor a pesar de los avatares de la vida. Siempre con su amplia sonrisa, siempre atenta, siempre activa.

A la gente del instituto, en especial a Laurita, Flor, Ale y Javi, que tantas veces con tan buena predisposición me han ayudado y aconsejado.

A mis amigas! A las de la vida, Maru, Pato, Maga, Vani, Gise y Euge, son mi cable a tierra me sacan un poco del contexto científico a la “vida real”, me han soportado tanto durante todos estos años de amistad, las quiero tanto! Y a las que me acompañan desde la infancia, Andre y Caro, que aunque no las vea tanto, las siento siempre conmigo, las llevo en mi corazón. Aunque hayamos elegido diferentes caminos, a pesar de la distancia, el cariño es incondicional. Mis hermanas del alma!

A los amigos que me dio la facultad, Julieta, Emiliano, Caro, Juliana, Nicok, Fabi, Isa, Alf (y “los pibes del club”), la Noe, Lau, Vero, Mari, Tami y Manu. Compartí tantos momentos maravillosos con todos y cada uno de ellos!

A la super turma de portu, Foli, Gra, Ruben y German, estoy tan feliz de haberlos conocido y de que formen parte de mi vida, siempre con buena onda, siempre bancando. Los adoro!

Y en particular quiero agradecer a TODA mi familia. A mi hermano, siempre preguntando por mis cosas, tratando de seguir mis logros a la distancia, y así lo siento cerca. A mi hermana, que me dio la alegría más maravillosa del mundo, mi sobrina! A quien amo! A mis primos, Jesi, Johe, Lean, Flor y Facu, que cuanto más pasa el tiempo, más unidos estamos, compartiendo muy lindos momentos. A mi tío David y mi tía “titi”

Ana, siempre al tanto de todos mis asuntos, preocupándose y ayudando en lo que pueden. Los quiero mucho a todos!

Y a los más importantes para el final, les agradezco con el alma a mis padres, sin ellos hubiera sido imposible llegar hasta acá. Siempre con el apoyo incondicional, preocupándose a cada momento por mí, por mi bienestar, haciendo lo posible y lo imposible por ayudarme en TODO. Muchas gracias! Los quiero mucho!

Índice

	Páginas
Resumen	3
Publicaciones	5
Abreviaturas	6
Introducción	8
Aprendizaje y Memoria	10
Tipos de memoria	10
Sistemas de memorias: Lóbulo temporal medial	12
Etapas de la memoria	15
La odisea de la “consolidación”	18
Cuestiones de mantenimiento: persistencia de la memoria	22
Bases moleculares de la persistencia	23
Corteza retrosplenial	28
Objetivos	33
Materiales y métodos	34
Resultados	46
<u>Capítulo I. Rol de la expresión de c-Fos en el hipocampo en el mantenimiento de una memoria duradera</u>	47
I. 1. La persistencia de la memoria de largo término requiere de síntesis tardía de mensajeros en el hipocampo.	48
I. 2. La persistencia de la memoria está asociada a dos ondas de expresión de c-Fos en el hipocampo.	51
I. 3. La persistencia de la memoria requiere una onda de expresión tardía de c-Fos en el hipocampo.	56
I. 4. La promoción de una memoria persistente depende de NE y requiere de c-Fos en el hipocampo.	67
<u>Capítulo II. Rol de la corteza retrosplenial en la formación y persistencia de una memoria</u>	71
II. 1. Cambios en la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial inducidos por aprendizaje.	72
II. 2. La síntesis de mensajeros en la corteza retrosplenial es necesaria para la formación de la MLT.	75

II. 3. La formación de la memoria requiere de síntesis proteica temprana y la persistencia requiere de síntesis proteica tardía en la corteza retrosplenial.	77
II. 4. El rol de la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial.	79
Discusión	81
Conclusiones generales	83
c-Fos al comienzo en el hipocampo	84
Aumento tardío de un gen temprano en el hipocampo	85
c-Fos vs. Zif268	87
Iniciando la cascada persistente	88
Expresión génica, plasticidad y persistencia de la memoria	89
Después de c-Fos, ¿qué sigue?	91
Consolidación celular y de sistemas	93
Más allá del hipocampo, la corteza retrosplenial	94
Distintos roles para transcripción y traducción	95
Marcadores de actividad en corteza retrosplenial... ¿Y el rol funcional?	97
Preguntas sin responder	99
Referencias	101

MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN LA PERSISTENCIA DE LA MEMORIA DE LARGO TÉRMINO: ROL DE C-FOS EN HIPOCAMPO Y CORTEZA RESTROSPLENIAL

Resumen

Un punto de vista predominante en la ciencia moderna de la memoria es que los recuerdos son inicialmente frágiles, pero se vuelven más estables con el tiempo. A pesar de que la persistencia es una característica fundamental en el almacenamiento de la memoria, su mecanismo se encuentra escasamente caracterizado. Para comprender los procesos que subyacen a la memoria de largo término (MLT) debemos entender cómo es que las trazas de memoria persisten a lo largo del tiempo, a pesar de la vida media corta y de la alta velocidad de recambio de sus sustratos moleculares. En este trabajo, mostramos que la MLT de evitación inhibitoria duradera pero no la que dura más allá de 2-3 días, depende de la expresión tardía de c-Fos en el hipocampo y en la corteza retrosplenial. Por otra parte, la inhibición de la transcripción en el hipocampo 24 h luego del entrenamiento afecta la persistencia, pero no la formación de la MLT. No obstante, la inhibición de la transcripción en la corteza retrosplenial impide la formación de la memoria. Además, mostramos que los requerimientos de traducción en la corteza retrosplenial alrededor del entrenamiento, en la formación de la memoria, y tardíamente luego del entrenamiento, en la persistencia de la memoria, son similares a los vistos en el hipocampo. Estos hallazgos indican que una fase de transcripción y traducción tardía son esencial para el mantenimiento de una traza de memoria inducida por miedo. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la existencia de rondas recurrentes de eventos como la consolidación, que ocurren luego del aprendizaje en el hipocampo y corteza retrosplenial para mantener las memorias.

Palabras clave: persistencia de la memoria; c-Fos; hipocampo; corteza retrosplenial; transcripción; traducción; evitación inhibitoria.

NEUROBIOLOGICAL MECHANISMS INVOLVED IN PERSISTENCE OF LONG-TERM MEMORY STORAGE: ROLE OF C-FOS IN THE HIPPOCAMPUS AND RETROSPLLENIAL CORTEX.

Abstract

A prevailing view of the modern science of memory is that memories are initially fragile but become more stable with time. Although persistence is a key characteristic of memory storage, its mechanisms are scarcely characterized. To understand the processes that underlie memory, we must comprehend how is it that memory traces persist despite the short-lived nature and rapid turnover of their molecular substrates. In this work, we show that long-lasting but not short-lived inhibitory avoidance long-term memory depends on a delayed expression of c-Fos in the hippocampus and retrosplenial cortex. Moreover, inhibition of transcription in the hippocampus 24 h after training hinders persistence but not formation of long-term storage. However, inhibition of transcription in the retrosplenial cortex impairs memory formation. In addition, translation requirements in the retrosplenial cortex around training, for memory formation, and late after training, for memory persistence, are similar of those seen in the hippocampus. These findings indicate that delayed phases of transcription and translation are essentials for maintenance of a fear-motivated memory trace. Our results support the hypothesis that recurrent rounds of consolidation-like events take place late after learning in the dorsal hippocampus and retrosplenial cortex to maintain memories.

Key words: memory persistence; c-Fos; hippocampus; corteza retrosplenial; transcription; translation; inhibitory avoidance.

Los experimentos presentados en este trabajo de tesis han resultado en las siguientes publicaciones:

Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage.

Katche C, Bekinschtein P, Slipczuk L, Goldin A, Izquierdo IA, Cammarota M, Medina JH. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5;107(1):349-54.

Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures.

Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. Neurotox Res. 2010 Nov; 18(3-4):377-85.

Molecular mechanisms in the retrosplenial cortex involved in memory persistence.

Katche C, Dorman G, Kramar C, Gonzalez C, Slipczuk L, Izquierdo IA, Cammarota M, Medina JH. (Manuscrito en preparación).

Abreviaturas

Ama: α -amanitina

AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico

Ani: anisomicina

Arc: proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro

CaMKII: proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II

C/EBP β : proteína beta de unión al elemento CCAAT

ASO *c-fos*: oligonucleótido antisentido contra *c-fos*

ASO *zif268*: oligonucleótido antisentido contra *zif268*

CPEB: proteína citoplasmática de unión al elemento de poliA

CREB: proteína de unión al elemento que responde a AMP cíclico

E: entrenamiento

EI: evitación inhibitoria

Eme: emetina

ERK1/2: proteína quinasa de regulación extracelular 1/2

IEG: gen inmediato temprano

ITF: factor de transcripción inducible

LTP: potenciación de largo término

MCT: memoria de corto término

MLT: memoria de largo término

MMP: metaloproteinasas de la matriz extracelular

MTL: lóbulo temporal medial

MSO *c-fos*: oligonucleótido sin-sentido contra *c-fos*

MSO *zif268*: oligonucleótido sin-sentido contra *zif268*

NE: norepinefrina

NMDA: N-metil- D-aspartato

ODN: oligonucleótidos

PI3K: proteína quinasa de fosfatidil inositol-3-fosfato

PKA: proteína quinasa A

PKB: proteína quinasa B

PKM ζ : proteína quinasa Mzeta

PLC γ : fosfolipasa C-gama

TrkB: receptor a tirosina quinasa B

Veh: vehículo

Introducción

A través de los sentidos somos capaces de percibir el mundo que nos rodea, y de todo aquello que hemos percibido, sólo una fracción se guarda en nuestra memoria. Nuestra memoria, la cual define quienes somos a través de las experiencias que hemos vivido. Podemos afirmar que somos aquello que recordamos. No podemos hacer aquello que no sabemos cómo se hace ni comunicar nada que no conozcamos, es decir, nada que no esté en nuestra memoria. El pasado, nuestra memoria, no sólo nos dice quienes somos, sino también nos permite proyectar rumbo al futuro, nos dice quien podríamos ser.

Quizá uno de los retos más interesantes y atractivos en la historia de la ciencia, haya sido y sea comprender las bases neurobiológicas de la memoria. Los procesos mentales por los cuales percibimos, actuamos, aprendemos y recordamos. Sabemos que todas las funciones mentales, de las más simples a las más complejas, tienen lugar en el cerebro. Sin embargo, aún no conocemos con precisión su localización y organización.

A lo largo de este trabajo, mostraremos y discutiremos una serie de resultados experimentales realizados con el objetivo de contribuir al conocimiento general sobre uno de los problemas más difíciles, desafiantes y excitantes de la neurociencia actual: entender cuáles son las bases neurobiológicas que subyacen a la formación y persistencia de una memoria duradera en el cerebro de los mamíferos. Para ello, empezaremos entonces por definir qué entendemos por memoria y aprendizaje, los tipos de memorias que se han descrito y estudiado, cuáles son las estructuras que participarían en la formación de estas memorias, cuáles son las etapas que llevan al almacenamiento de una memoria y cuáles son los conocimientos actuales sobre algunos de los eventos moleculares y celulares que estarían involucrados en la formación y persistencia de la memoria.

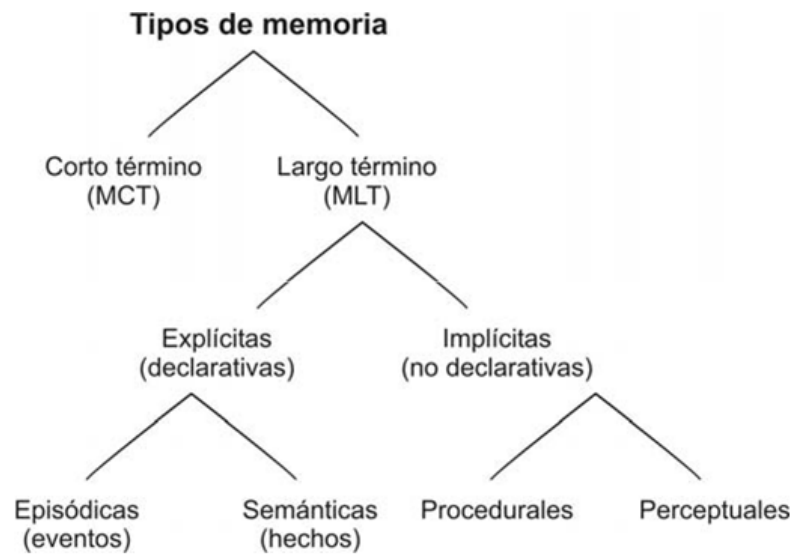
Aprendizaje y Memoria

¿Qué es la memoria? Varias son las definiciones que nos vienen a la mente cuando tratamos de responder esta pregunta. Una posible respuesta es aquella que la define como la representación interna del mundo (conocimiento), versiones del mundo codificadas y estructuradas neuronalmente en el sistema nervioso central, las que pueden, llegado el caso, guiar el comportamiento. En otras palabras, modelos adquiridos del mundo, codificados espacio-temporalmente en actividad cerebral.

¿Y cómo se construye la representación interna del mundo?: a través del aprendizaje. ¿Y qué es, pues, el aprendizaje? Es el proceso por el cual adquirimos nuevo conocimiento acerca del mundo. Es decir, el proceso mediante el cual creamos o modificamos nuestra representación interna del mundo, producida por la experiencia. Tales modificaciones pueden persistir durante un tiempo apreciable o durante toda la vida.

Tipos de memoria

Está ampliamente aceptado que existen múltiples tipos de memoria que están “mapeadas” en distintos circuitos anatómicos del cerebro. Aunque se han desarrollado varios esquemas taxonómicos para los diferentes tipos de memoria, la mayoría comparten una forma genérica común (ver **Esquema I.1**).



Esquema I.1. Taxonomía de los tipos de memoria. La memoria de largo término se puede dividir en memorias explícitas (declarativas) e implícitas (no declarativas). La memoria implícita afecta a la conducta sin participación de la conciencia. La memoria explícita se subdivide en memoria semántica, representando el conocimiento general sobre el mundo, y la memoria episódica, representando el conocimiento personal sobre el pasado propio. Aunque esta forma genérica de división se aplica directamente a los sistemas de memoria en humanos, una clasificación similar sería aplicable a la memoria en animales, aunque pueda carecer de algunas características típicas de las memorias en humanos.

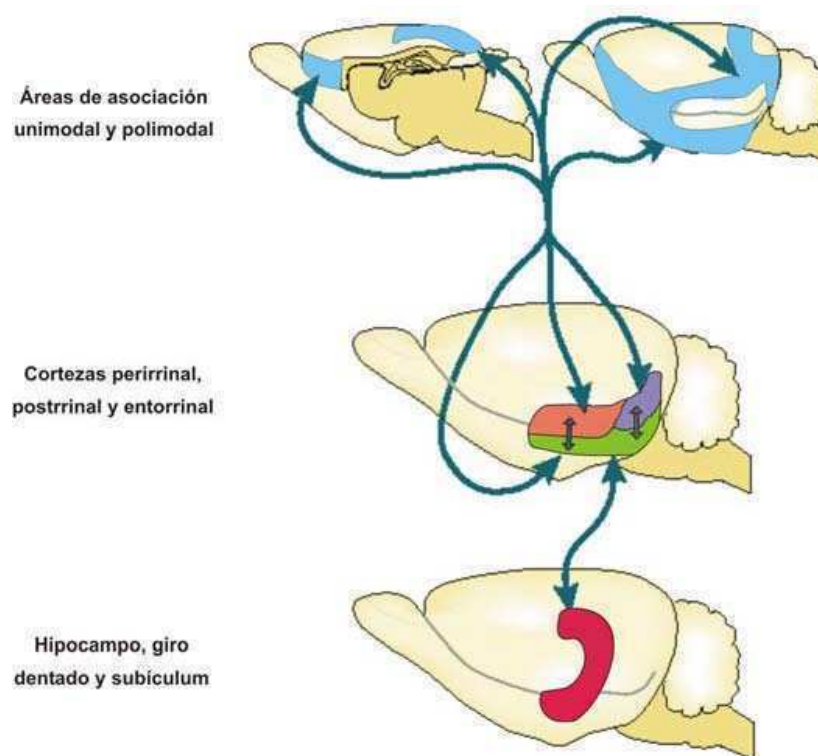
Primero se hace la distinción entre memorias de corto y largo término (MCT y MLT), y esta última se divide en explícitas (o declarativas) e implícitas (o no declarativas). Las memorias explícitas se suelen subdividir en semánticas (hechos) y episódicas (eventos): la primera consiste en información sobre el mundo, como cuál es la capital de Canadá o que los perros son cuadrúpedos que no vuelan, mientras que la segunda se caracterizó originalmente como la evocación consciente de eventos específicos del pasado personal en humanos (Tulving 1983). Sin embargo, para investigar los mecanismos neurales y celulares subyacentes en animales, algunas de

estas definiciones originales de las memorias presentan dificultades. Respecto a la cognición semántica, existen evidencias de que animales no humanos efectivamente dividen el mundo categóricamente en objetos y que, aunque no poseen expresiones verbales, pueden demostrar a través de su comportamiento que “saben” qué son esos y otros tipos de objetos (Clayton y col. 2003). Además, algunos estudios recientes modelan la memoria episódica en animales como una memoria de cuándo, dónde y qué evento ha ocurrido (Clayton y Dickinson 1998), o como la memoria de la propia conducta del animal (Hampton 2001).

Sistemas de memorias: Lóbulo temporal medial

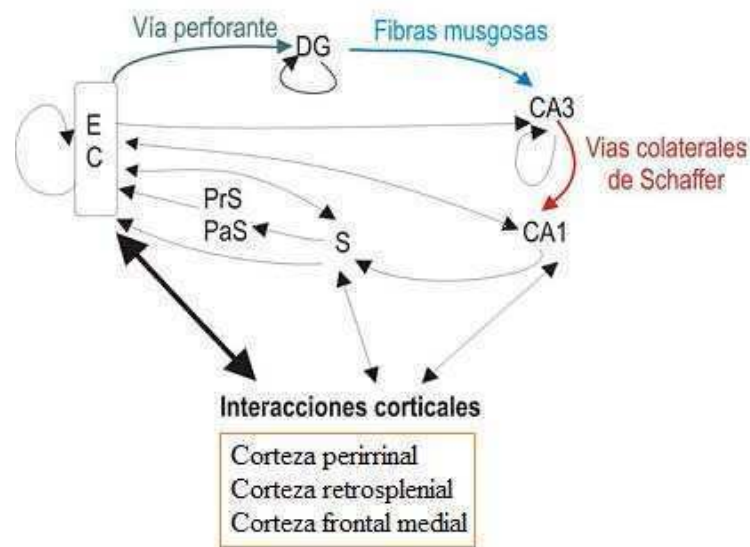
En términos psicológicos, los sistemas de memorias son considerados módulos especializados que procesan una clase de información particular (por ejemplo hechos o eventos; Squire y Zola 1996), o guardan información por un período particular de tiempo (por ejemplo memoria de corto y largo término; Squire y Zola 1996; Izquierdo y col. 1999; McGaugh 2000). En términos biológicos, un sistema de memoria es definido como una estructura neural y sus interconexiones, que en conjunto procesan un tipo particular de información y participan en el guardado de tal información, tanto dentro como fuera de la propia estructura (Kim y Baxter 2001). Un sistema de memoria anatómicamente definido es el **lóbulo temporal medial** (MTL) (ver **Esquema I.2**), que incluye la formación hipocámpica: el hipocampo propiamente, el giro dentado, el subículum y la corteza entorrinal (ver **Esquema I.3**) – y cortezas adyacentes – perirrinal y postrrinal– (Amaral y Witter 1995; Squire y Zola 1996; Kandel y col. 1996; Burwell y Amaral 1998).

El MTL, en particular el hipocampo, es un lugar de convergencia multimodal. Contiene neuronas que son sensibles a la configuración de muchos estímulos ambientales, así como al contexto conductual en el cual ocurren los eventos (O'Keefe y Nadel 1978). El hipocampo se considera crítico para la formación de memorias explícitas de largo término, las cuales se asume que dependen de este tipo de información configuracional así como de circuitos neurales hipocampales específicos (O'Keefe y Nadel 1978).



Esquema I.2 Sistema de memoria del lóbulo temporal medial y sus conexiones. En la rata la información que llega al hipocampo proviene de áreas de asociación de la neocorteza (azul). Ésta proyecta a las cortezas perirrinal (naranja), postrrinal (violeta) y entorrinal (verde), que están a su vez interconectadas. De este modo, la corteza entorrinal es un sitio de convergencia y distribución de la información proveniente de la corteza al hipocampo en sí, giro dentado y subiculum (rojo). Al mismo tiempo, es la principal vía de salida de la información desde el hipocampo, giro dentado y subiculum.

La mayor entrada hacia el giro dentado y una de las entradas más importantes hacia el hipocampo y el subiculum proviene de la corteza entorrinal que a su vez, recibe información de una variedad de regiones corticales. Sabemos específicamente que el hipocampo está conectado con la amígdala y otras áreas de la corteza que también han sido implicadas en el procesamiento de la memoria. A su vez, la corteza entorrinal recibe aferentes que llegan de las distintas regiones del hipocampo, sobre neuronas que a su vez mandan proyecciones a distintas áreas de la corteza (**Esquema I.3**). Este sistema, y particularmente el hipocampo ha sido involucrado en la formación de memorias de tipo declarativas. Sin embargo no está claro, cuál es su función específica y durante cuánto tiempo es necesario.



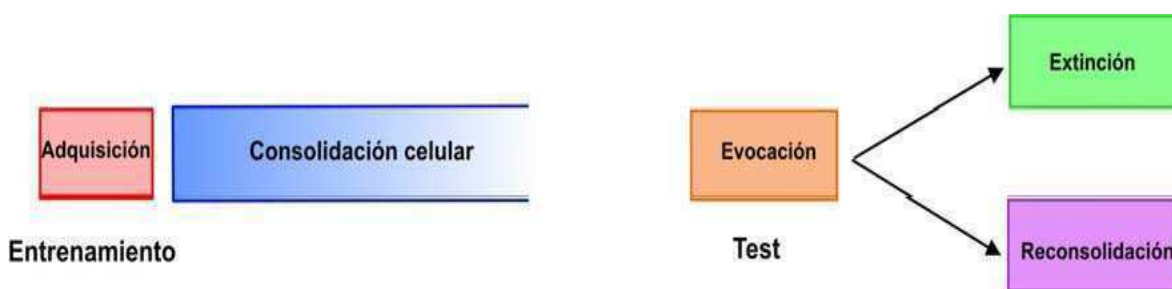
Esquema I.3. Conexiones intrínsecas de la formación hipocámpica. En la rata el término “formación hipocámpica” comprende seis regiones cito-arquitectónicamente diferentes: el hipocampo propiamente dicho que a su vez se divide en tres regiones (CA1, CA2 y CA3), el giro dentado (GD), el subiculum (S), el presubiculum (PrS), el parasubiculum (PaS) y la corteza entorrinal (CE). Notar que muchas de las vías señaladas – la vía perforante (verde), las fibras musgosas (celeste) y las colaterales de Schaffer (roja) – son unidireccionales. Además, se señala que existen interacciones corticales y subcorticales.

Etapas de la memoria

La formación de una memoria no se trata de un proceso único, sino que es el resultado de la integración de etapas o procesos, en los cuales pueden intervenir diferentes mecanismos. Las definiciones modernas atribuyen a la memoria los procesos de **adquisición** de la información, guardado (**consolidación**) y **evocación**. Dicho de otro modo, para tener memoria de algún suceso, primero hay que **adquirir** la información pertinente. Luego, la memoria deberá atravesar una etapa de **consolidación** en la que será guardada en un sistema de almacenamiento de largo término. Finalmente, para poder recordar, tiene que existir un mecanismo que permite poner en juego la memoria: la **evocación** (ver **Esquema I.4**). Además, la evocación de un recuerdo puede tener profundas influencias sobre el propio recuerdo y sobre un comportamiento subsiguiente, por ejemplo, puede iniciar la **extinción**. Pero extinción no es un sinónimo de borrado u olvido, las memorias extinguidas pueden ser revividas mediante alguna clave recordatoria y en particular si se recrea la situación que dio lugar al aprendizaje original (Ahlers y col. 1989; Izquierdo 1989). La extinción consiste en la inhibición gradual de la evocación del aprendizaje original, y no en el borrado de la memoria (Myers y Davis 2002).

Se ha propuesto también que la evocación podría desencadenar la **reconsolidación** de la traza de memoria. Dicho de otro modo, una memoria ya consolidada, al ser reactivada, se vuelve sensible a tratamientos que se sabe impiden la consolidación de la traza de memoria original (Misanin y col. 1968; Judge y Quartermain 1982; Nader y col. 2000; Sara 2000; Taubenfeld y col. 2001a; Debiec y col. 2002; Milekic y Alberini 2002; Pedreira y col. 2002; Pedreira y Maldonado 2003; Dudai y Eisenberg 2004; Boccia y col. 2005; Boccia y col. 2010).

Asimismo, los procesos de consolidación, reconsolidación y extinción de la memoria pueden ser altamente modulados por diversos neurotransmisores, hormonas y señales periféricas (McGaugh 2004; Boccia y col. 2009; Boccia y col. 2010). Sin embargo, los mecanismos involucrados en estas fases de la memoria exceden los objetivos de esta tesis (para una revisión ver Izquierdo y Medina 1997; McGaugh 2000)



Esquema I.4. Las etapas de la memoria. Varias etapas han sido descritas para el procesamiento de la memoria. El aprendizaje ocurre durante una etapa inicial de adquisición. Luego la memoria atraviesa un período de consolidación que puede durar horas y se caracteriza por el requerimiento de la transcripción y de la traducción. Los inhibidores de la síntesis de proteínas interfieren con la consolidación de la memoria e impiden la formación de la MLT. La evocación de la memoria ocurre durante la sesión de test. La evocación puede desencadenar al menos dos procesos: 1) la reconsolidación, definida como la susceptibilidad de la MLT a la acción de inhibidores de la síntesis de proteínas luego de una sesión de test en ausencia del refuerzo; y 2) extinción, que es un proceso que causa una disminución en la retención de la memoria luego de su evocación no reforzada e involucra el aprendizaje de una nueva asociación y no una reversión en el aprendizaje de la asociación original.

Entre las etapas mencionadas, la más estudiada ha sido y es la etapa de consolidación. La idea de que las memorias atraviesan una etapa de consolidación surgió a partir de un estudio realizado por Müller y Pilzecker (1900) con seres humanos.

Ellos encontraron que la memoria de cierta información A se perdía, si otra información B era aprendida inmediatamente luego de haber adquirido la información A. Basados en estos resultados, propusieron la hipótesis de la preservación o consolidación de las memorias. Ésta sugiere que el proceso que subyace a la formación de nuevas memorias persiste inicialmente en un estado frágil y que se consolida con el tiempo.

Muchas de las convicciones acerca de la consolidación de las memorias, surgieron a partir de estudios realizados en pacientes que tenían dañada alguna región particular del cerebro, o de personas que quedaron inconscientes durante un tiempo debido a un accidente. En ese sentido, el primer caso bien estudiado acerca de la memoria es el del paciente HM (Scoville y Milner 1957), a quien le fueron removidos parte de sus lóbulos temporales, incluyendo el hipocampo, giro dentado y subículum, la corteza entorrinal, perirrinal y amígdala. HM sufrió durante años ataques epilépticos a consecuencia de un daño cerebral a los 9 años de edad, cuando fue atropellado por alguien que andaba en bicicleta. De adulto, no pudo llevar una vida normal, trabajar o tener una familia. La pérdida de algunas porciones de sus lóbulos temporales lo dejó con un déficit de memoria devastador. Éste fue bastante específico, dado que HM conservaba intacta la memoria de muy corto plazo (segundos o minutos) y tenía una memoria perfecta para hechos que ocurrieron antes de la operación. Recordaba su nombre y eventos de su niñez, aunque tenía cierto grado de amnesia para la información adquirida en los años cercanos a la cirugía (amnesia retrógrada). Retenía perfectamente bien el lenguaje y su variado vocabulario y su coeficiente intelectual permaneció en el rango de lo normal. Lo que no podía hacer ahora era transferir una memoria de corto término a una permanente. Retenía por muy poco tiempo la nueva información concerniente a lugares, gente, u objetos (amnesia anterógrada). Nunca reconoció a la doctora Milner, a pesar de haberla visto mensualmente por varios años. Ante cada

encuentro, reaccionaba como si nunca la hubiera visto antes. Al mismo tiempo, tenía tremendos problemas de orientación espacial, tantos, que le tomó casi un año aprender el camino a su nueva casa.

Este, y otros casos clínicos en los que se estudiaron pacientes con lesiones similares a HM han contribuido a la idea de que la formación hipocámpica sería un sistema de memoria transitorio, que dejaría de ser necesario una vez que la memoria se ha guardado de manera permanente en la neo-corteza u otras estructuras, es decir, una vez que la memoria se ha consolidado. En particular, la integridad del hipocampo pareciera ser un prerequisite para la normal adquisición y consolidación de información acerca de las asociaciones y relaciones entre estímulos. (Cemark y O'Connor 1983; Rempel-Clower y col. 1996; Teng y Squire 1999).

La odisea de la “consolidación”

En el año 1949, Donald Hebb allanó el terreno para lo que se convertiría en uno de los grandes dogmas de la memoria: la teoría de la doble traza. Esta teoría revivió la idea de la perseverancia de Müller y Pilzecker (1900), al postular la existencia de una MCT en forma de actividad reverberante en circuitos locales. Esta reverberación induciría cambios estructurales en las sinapsis de la red reverberante y permitiría que la memoria se almacenara en forma persistente como MLT (Hebb 1949). Estas ideas provocaron un cambio en el estudio de la memoria. La idea de que las modificaciones estructurales subyacían a la MLT, sugirió un rol para la síntesis de proteínas en este proceso que fue confirmado experimentalmente (para una revisión ver Davis y col. 1984; McGaugh 2000). De hecho, uno de los dogmas consensuados entre los expertos es que, luego de la adquisición, la memoria se divide en al menos dos fases: una que

dura entre minutos y unas horas (MCT) y es independiente de la síntesis de ARNm y de proteínas, y una que dura al menos 24 horas (MLT) y depende de la transcripción y la traducción (McGaugh 2000; Kandel 2001). Experimentalmente, se demostró que la infusión intracerebral de inhibidores de la síntesis de proteínas es capaz de producir un déficit en la MLT, pero no en la MCT (Agranoff 1965; Barondes 1970; Davis y col. 1984; Izquierdo y col. 1998; McGaugh 2000). Más aún, el efecto amnésico de estos inhibidores depende del momento en el cual se realiza la administración. La sensibilidad a estos inhibidores varía según la especie y la tarea aprendida, y puede durar minutos o hasta 6 horas luego del entrenamiento (Flood y col. 1975; Davis y col. 1976; Grecksch y col. 1980; Montarolo y col. 1986; Rosenblum y col. 1993; Ghirardi y col. 1995; Pedreira y col. 1995; Bourtchouladze y col. 1998; Schafe y col. 2000b; Igaz y col. 2002; Scharf y col. 2002). Estos hallazgos le dieron un sustrato molecular a las observaciones de Müller y Pilzecker y permitieron postular que la característica principal de la consolidación de la MLT era el requerimiento de síntesis de nuevas proteínas (McGaugh 2000; Kandel 2001). Inclusive, experimentos posteriores identificaron que el requerimiento de síntesis proteica no era continuo luego del entrenamiento sino que, en varios casos, la sensibilidad a inhibidores de la síntesis de proteínas se expresaba en momentos discretos, luego de la adquisición de una tarea (Bourtchouladze y col. 1998; Quevedo y col. 1999; Igaz y col. 2002). De esta forma, se encontraron al menos dos ondas o picos de requerimiento de traducción para la consolidación de la memoria de varios aprendizajes: uno al momento del entrenamiento y otro entre 3 y 6 h más tarde. Pasadas unas horas, los inhibidores de la traducción eran inefectivos para causar amnesia a las 24 horas del entrenamiento, indicando que la consolidación se completa en unas pocas horas (Igaz y col. 2002).

Por otra parte, los experimentos de Muller y Pilzecker acerca de la perseverancia tomaron fuerza en la psicología como una forma de comprender la amnesia retrograda observada luego de lesiones cerebrales. No obstante, la pérdida de memoria por lesiones puede extenderse a varios años previos a esa lesión. Por lo tanto, la amnesia retrograda más prolongada no podía ser explicada en términos de una consolidación que dura unas pocas horas.

Durante los últimos 15 años se ha intentado combinar los dos fenómenos antes mencionados: 1) las observaciones a nivel molecular de que la memoria es susceptible a manipulaciones farmacológicas por unas horas luego de un entrenamiento, y 2) la existencia de amnesia retrograda que puede extenderse a lo largo de días en animales y hasta años en humanos al producirse una lesión en el MTL. El resultado es una hipótesis bastante intuitiva y poco explicativa: la consolidación involucra una reorganización a **nivel celular o sináptico** y también una reorganización a **nivel de sistemas** (Dudai y col. 2004; Frankland y col. 2005; Morris 2006). La consolidación celular o sináptica se completa en unas horas luego del entrenamiento e implica la estabilización de los cambios en la conectividad sináptica en circuitos locales (por ejemplo, el crecimiento de nuevas conexiones y la reestructuración de otras ya existentes). La consolidación a nivel de sistemas es un proceso temporalmente mucho más largo e involucra la reorganización gradual de las regiones que subyacen a la traza de memoria (por ejemplo, un cambio dependiente del tiempo en los circuitos necesarios para la evocación de una memoria) (Dudai y col. 2004; Frankland y col. 2005; Morris 2006).

Encontramos en la literatura científica numerosas evidencias de la consolidación celular (para una revisión ver McGaugh 2000; Kandel 2001; Izquierdo y col. 2006). Además, se han identificado varias de las cascadas de señalización intracelular, de los factores de transcripción y algunos de los genes involucrados en este proceso (Abel y

col. 1997; Izquierdo y Medina 1997; Kandel 2001; Sweatt 2004). Entre ellas, la cascada de la proteína quinasa A (PKA) (Brunelli y col. 1976; Bernabeu y col. 1997; Bourtchouladze y col. 1998; Schafe y col. 2000b; Locatelli y col. 2002), las quinasas reguladas extracelularmente (ERK1/2) (Atkins y col. 1998; Selcher y col. 1999; Schafe y col. 2000a; Alonso y col. 2002c; Gooney y col. 2002; Bozon y col. 2003; Kelleher y col. 2004; Sweatt 2004; Trifilieff y col. 2006), los factores de transcripción CREB (Montarolo y col. 1986; Bernabeu y col. 1997; Bartsch y col. 1998; Taubenfeld y col. 2001b; Bozon y col. 2003; Trifilieff y col. 2006), c-Fos (Morrow y col. 1999; Cammarota y col. 2000; Guzowski 2002; He y col. 2002; Fleischmann y col. 2003; Countryman y col. 2005; Yasoshima y col. 2006) y C/EBP β (Alberini y col. 1994; Taubenfeld y col. 2001a; Yefet y col. 2006) y algunos genes efectores como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Qiao y col. 1998; Hall y col. 2000; Mizuno y col. 2000; Tokuyama y col. 2000; Johnston y Rose 2001; Alonso y col. 2002a; Egan y col. 2003; Lee y col. 2004; Liu y col. 2004; Monteggia y col. 2004; Pezawas y col. 2004; Rattiner y col. 2004; Alonso y col. 2005; Ou y Gean 2006).

Sin embargo, algunos autores aún cuestionan el rol de la síntesis *de novo* de proteínas en la formación de la memoria. Una hipótesis alternativa propone que la modificación post-traduccional de proteínas pre-existentes es necesaria y suficiente para la MLT, y que la transcripción y la traducción simplemente funcionan como mecanismos de reposición de proteínas usadas en las sinapsis (Routtenberg y Rekart 2005). Otra posibilidad que contemplan algunos autores, es que la síntesis de nuevas proteínas es importante para la modulación, pero no para la consolidación de la MLT, y no constituye el sustrato de la traza de memoria (Gold 2006).

La consolidación a nivel de sistemas está avalada por un menor número de evidencias señaladas en los importantes trabajos publicados por el grupo de Frankland

y Bontempi (Frankland y col. 2001; Frankland y col. 2004; Maviel y col. 2004) durante los últimos diez años. Estos trabajos indican que, mientras que la evocación de una memoria espacial reciente activa el hipocampo y la corteza entorrinal, la evocación de una memoria remota está asociada a la activación (relacionada con el consumo de glucosa o a la inducción de genes como c-Fos y Zif268) de zonas de la corteza prefrontal, frontal, cíngulo anterior, corteza retrosplenial y corteza temporal (Maviel y col. 2004). Resultados similares fueron obtenidos para la evocación de una memoria asociativa de miedo (Frankland y col. 2004). Pero a pesar de que estos experimentos apoyan claramente la hipótesis de una consolidación de sistemas, el hecho de que una zona se active durante la evocación de una memoria, no quiere decir que la traza esté almacenada en esa región, sino solamente que participa del mecanismo necesario para la evocación.

Un trabajo del grupo de Morris (2007) sugiere que una memoria espacial dejaría de depender de la integridad del hipocampo luego de dos días de la adquisición (Tse y col. 2007), indicando que, al menos para esta tarea, la consolidación a nivel de sistemas se completaría en un tiempo corto relativo a los gradientes propuestos por los trabajos anteriores.

Cuestiones de mantenimiento: persistencia de la memoria

Dentro del marco de lo expuesto en los párrafos anteriores, aún quedan en el tintero los mecanismos por los cuales se mantendría la traza en el hipocampo mientras se transfiere y almacena en las cortezas (proceso que podría tardar días o meses) (Frankland y Bontempi 2005). Si los eventos moleculares que se inducen con el aprendizaje continúan por horas o días luego del entrenamiento, la activación de

cascadas de señalización intracelulares y la síntesis de macromoléculas podrían mantener las modificaciones sinápticas producidas por el aprendizaje hasta que los circuitos se reorganicen y la traza sea almacenada en la corteza. Por lo tanto, un bloqueo del proceso de mantenimiento de la traza en el hipocampo afectaría un posible proceso de transferencia a la corteza; por lo tanto, existiría una consolidación completa a nivel celular pero incompleta a nivel de sistemas, y se vería un decaimiento más rápido de la memoria a lo largo de los días.

El hallazgo de una fase dependiente de síntesis de proteínas y de BDNF en el hipocampo necesaria para la persistencia de la MLT (Bekinschtein y col. 2007; Bekinschtein y col. 2008) da cuenta del posible mecanismo que mantendría la memoria en el hipocampo mientras el engrama se transfiere a la corteza. Así, la inhibición de la síntesis de proteínas o de BDNF durante el período crítico interferiría con el mantenimiento de la memoria en el hipocampo causando una transferencia incompleta y una memoria que no persiste a lo largo del tiempo.

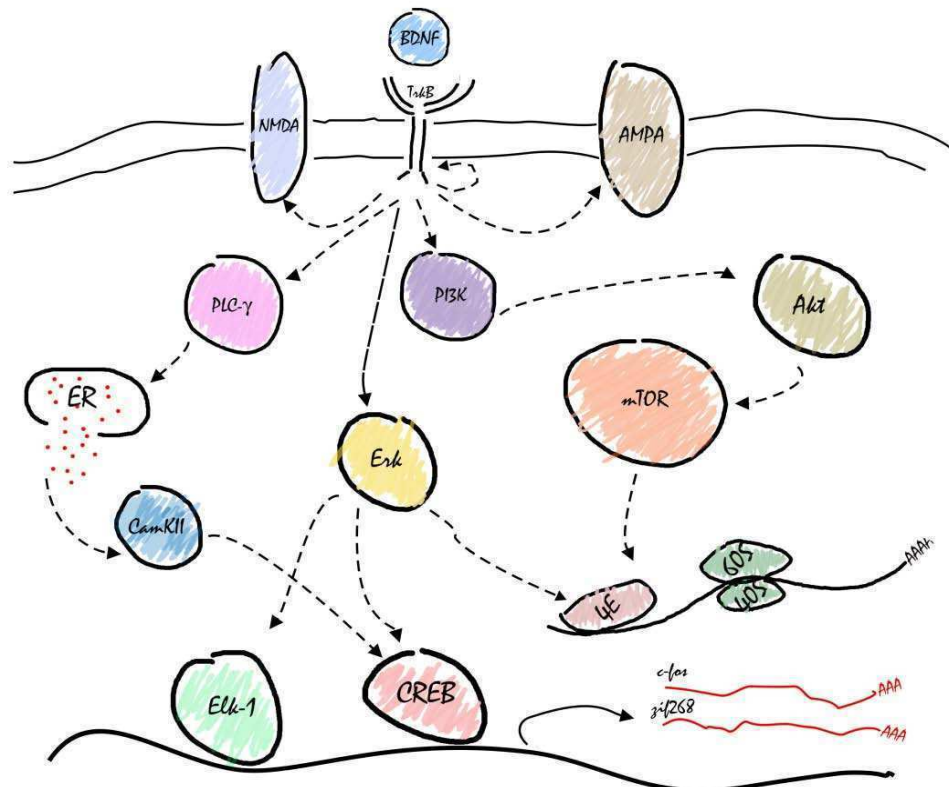
Bases moleculares de la persistencia

La vida media de las proteínas es relativamente corta comparada con la duración de las memorias. Entonces, ¿qué mecanismos moleculares podrían permitir el mantenimiento de la traza mnésica? Una posible explicación involucra rondas recurrentes de activación neuronal (Wittenberg y col. 2002) que producirían cambios moleculares que podrían preparar a una población neuronal para participar en futuros episodios de plasticidad sináptica por reforzamiento en la eficacia de la transmisión sináptica y crecimientos de dendritas y axones (Lamprecht y LeDoux 2004, Tolwani y col. 2002).

Sin embargo, actualmente son pocos los trabajos que han colaborado con el esclarecimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento de los cambios sinápticos vinculados con el almacenamiento persistente de la memoria. Los candidatos más destacados hasta el momento son el BDNF y PKM ζ .

El BDNF pertenece a una familia de factores tróficos denominados neurotrofinas (McAllister y col. 1999; Huang y Reichardt 2001; Binder y Scharfman 2004). En el cerebro adulto, el BDNF es importante para la transmisión sináptica excitatoria y la plasticidad (Poo 2001; Tyler y col. 2002; Bramham y col. 2005). Su expresión es regulada por dopamina (Küppers y Beyer 2001), se sintetiza, se almacena y es liberado por neuronas glutamatérgicas, y su receptor, el TrkB, se expresa abundantemente en sinapsis glutamatérgicas (Bramham y col. 2005). Además, esta proteína es necesaria y suficiente para el mantenimiento de la potenciación de largo término (LTP) en el hipocampo, probablemente la forma más estudiada de plasticidad sináptica (Bramham y col. 2005; Lu y col. 2008), que podría ser uno de los mecanismos celulares subyacentes a la MLT (Pastalkova y col. 2006; Whitlock y col. 2006).

Durante la última década se acumuló una gran cantidad de evidencias que sugieren que el BDNF juega un papel crucial en el aprendizaje y la memoria (Qiao y col. 1998; Hall y col. 2000; Mizuno y col. 2000; Tokuyama y col. 2000; Johnston Rose 2001; Alonso y col. 2002a; Egan y col. 2003; Lee y col. 2004; Liu y col. 2004; Monteggia y col. 2004; Pezawas y col. 2004; Rattiner y col. 2004; Alonso y col. 2005; Ou y Gean 2006). A través de la unión a su receptor TrkB, el BDNF es capaz de regular la transcripción y la traducción necesarias para la plasticidad sináptica y la memoria mediante, al menos, tres cascadas de señalización intracelular: 1) ERK 1/2, 2) PI3K y 3) PLC γ (ver **Esquema I.5**).



Esquema I.5. Vías de señalización intracelular activadas por la unión del BDNF a su receptor TrkB. La caricatura describe las principales cascadas bioquímicas involucradas en las acciones conocidas del BDNF sobre la plasticidad sináptica y la memoria. La unión del BDNF a su receptor TrkB puede modular rápidamente la actividad de los receptores NMDA y AMPA que están en la membrana, o puede regular la transcripción y la traducción a través de tres vías de señalización intracelular: PLC γ (fosfolipasa C gama), proteína quinasa regulada extracelularmente (ERK) y proteína quinasa de fosfatidil inositol-3-fosfato (PI3K). La activación de la PLC γ produce una liberación de calcio del retículo endoplásmico (ER) y la activación de proteínas quinasas dependientes de calcio-calmodulina (CamKII), que resultan en la fosforilación de CREB y la activación de la transcripción. El BDNF también activa la proteína PI3K que puede fosforilar a la proteína quinasa B (Akt/PkB) y a la proteína blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR), regulando así la iniciación de la traducción mediante la modulación de la actividad del factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E o 4E), entre otros sustratos. La activación de la vía de ERK puede regular la transcripción a través de la fosforilación de CREB y la proteína similar a E-26 1 (Elk-1) o la traducción mediante la fosforilación del eIF4E. La expresión génica inducida por CREB puede involucrar la transcripción de los ARNm de IEGs como *c-fos* y *zif268*.

En nuestro laboratorio, hemos demostrado previamente que la activación de la vía ERK1/2 mediada por BDNF 12 horas post-entrenamiento, es crucial para el guardado de una memoria persistente, en detrimento de las otras dos vías (Bekinschtein y col. 2008). La activación de la cascada de ERK1/2 lleva a la unión del factor de transcripción CREB al elemento de respuesta a AMPc (CRE) de los promotores de genes inmediatos tempranos (IEGs), tales como *c-fos* y *zif268* (Alonso y col. 2002b; Bozon y col. 2003; Arthur y col. 2004; Riccio y col. 2006), cuya expresión tardía –18-24 horas luego de un entrenamiento de evitación inhibitoria (EI)– está desencadenada por la acción de BDNF durante la fase de persistencia en el hipocampo. Los aumentos en los niveles de estos IEGs se bloquean por tratamientos que afectan la persistencia de la memoria, como la inhibición de la síntesis de proteínas o la actividad del BDNF 12 horas luego del entrenamiento (Bekinschtein y col. 2007). De esta manera, el BDNF estaría regulando la expresión de IEGs como c-Fos y Zif268 que, a su vez, podrían modular la transcripción de una variedad de genes blanco. Asimismo, trabajos recientes muestran que la persistencia de la memoria podría estar regulada por modificaciones epigenéticas que regulan la expresión de genes (Day y Sweatt 2010).

En resumen, la fase de persistencia depende de síntesis de proteínas y de BDNF a las 12 horas de un entrenamiento en una tarea aversiva en hipocampo (Bekinschtein y col. 2007; Bekinschtein y col. 2008) y en amígdala (Ou y col. 2010). El aumento de BDNF hipocampal durante la fase de persistencia, es el producto de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D1 mediada por la dopamina proveniente de la VTA (Rossato y col. 2009). El BDNF es necesario y suficiente para promover una memoria duradera a través de la activación de ERK 1/2 vía los receptores específicos TrkB (Bekinschtein y col. 2008) (Ver **Esquema I.5**). A su vez, la cascada activada por BDNF estaría induciendo la expresión de IEGs (genes inmediatos tempranos), como c-Fos y

Zif268, ampliamente relacionados con mecanismos de plasticidad sináptica. Además, la inhibición de la síntesis proteica y de la síntesis y actividad de BDNF a las 12 horas, bloquean los aumentos de c-Fos y Zif268 inducidos por el aprendizaje a las 24 horas del entrenamiento (Bekinschtein y col. 2007).

¿Cuál es la importancia de los IEGs? Tal vez uno de los más importantes avances en la comprensión de cómo se codifican las modificaciones permanentes en el sistema nervioso fue el descubrimiento del IEG *c-fos* en neuronas del cerebro. Los IEGs son genes de inducción rápida y transitoria, insensibles a inhibidores de síntesis proteica, en varios tipos celulares (Curran y Morgan 1987). Los IEGs se pueden clasificar a en: 1) los “IEGs regulatorios”, que codifican para proteínas que pueden aumentar o disminuir la expresión de genes “río abajo” y 2) los “IEGs efectores”, que codifican para proteínas que tienen un rol funcional más directo en las sinapsis. Los productos proteicos de los genes reguladores se denominan factores de transcripción inducibles (ITFs), para diferenciarlos de factores de transcripción constitutivos como CREB y Elk-1, que son regulados por modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación. Los IEGs, incluyendo los ITFs *c-fos* y *zif268*, son el primer grupo de genes que se expresan luego de la activación sináptica (Guzowski 2002). En particular, el gen de *c-fos* codifica para la proteína c-Fos, la cual se dimeriza con proteínas de la familia Jun (c-Jun, Jun-B, Jun-D) para formar el factor de transcripción AP-1, que a su vez regula la expresión de varios genes efectores (Greenberg y Ziff 1984; Kubik y col. 2007). La expresión rápida y transitoria de c-Fos está asociada a los eventos iniciales de la formación de la memoria en varias tareas de aprendizaje (Izquierdo y Medina 1997; Tischmeyer y Grimm 1999; Guzowski 2002; Kubik y col. 2007) y el apagado del gen de *c-fos* o la inhibición de su expresión en el momento del entrenamiento interfiere con la formación de la memoria (Lamprecht y Dudai 1996; Tischmeyer y Grimm 1999; He y

col. 2002). Sin embargo, aún no se ha estudiado el rol de estos factores de transcripción en los mecanismos de persistencia de la memoria.

En forma alternativa, pero no excluyente, se vió que la persistencia de la MLT dependería de la activación persistente de una isoforma atípica de la proteína quinasa C, llamada proteína quinasa Mzeta (PKM ζ) que carece del dominio regulatorio, lo cual le adjudica la característica de ser constitutivamente activa (Sacktor y col. 1993). Varios trabajos han demostrado que la inhibición local de la PKM ζ en diferentes regiones de cerebro, produce un “borrado” rápido de la MLT de varios tipos de aprendizaje en roedores, luego de días, semanas e incluso meses después del entrenamiento (Pastalkova y col. 2006; Shema y col. 2007; Serrano y col 2008; Kwapis y col 2009; Shema y col. 2009; Hardt y col. 2010; Madronal y col. 2010; Miguez y col. 2010; Sacco y Sachetti, 2010; von Kraus y col. 2010).

Sin embargo, resultados recientes muestran que el “borrado” de la MLT producido por la inhibición de la PKM ζ podría ser tal vez sólo una disrupción temporal de la expresión de la memoria (Parsons y Davis 2011).

Corteza retrosplenial

Han transcurrido 100 años desde que Brodman delinea la corteza retrosplenial (áreas 29 y 30) dentro de la región del cíngulo posterior en humanos. Lamentablemente, se realizaron muy pocos avances en el entendimiento de la corteza retrosplenial en los 90 años que siguieron, hasta que Vogt planteó: “nada se sabe acerca de su función” (Vogt y col. 2000). Las primeras ideas acerca de la función de la corteza retrosplenial rondaban sobre su rol potencial en los sistemas cerebrales que regulan la emoción. El ejemplo más claro acerca de ello es el circuito de Papez (Papez 1937), en el cual las

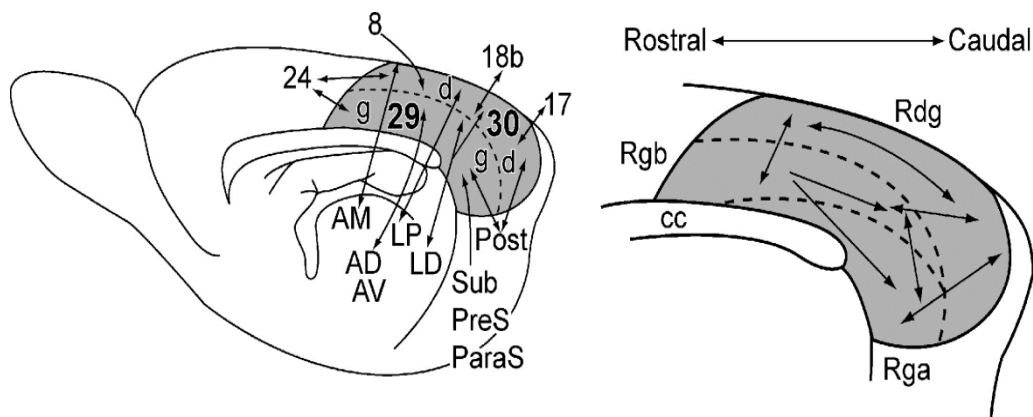
proyecciones desde el núcleo talámico anterior a la corteza del cíngulo y desde allí hacia otras regiones corticales colorean emocionalmente nuestros procesos psíquicos. El concepto de Paul MacLean (1949) sobre el “cerebro visceral” afirmaba las ideas de Papez, citando evidencia de que la estimulación de las cortezas del cíngulo pueden evocar cambios autonómicos que están vinculados con la emoción. Sin embargo, este enfoque previo sobre emoción y regulación autonómica puede haber desviado la atención de la importancia potencial de esta estructura en otras funciones cognitivas.

El término “retrosplenial” define la posición de dicha corteza por detrás del esplenio, la parte más caudal del cuerpo calloso. En primates, la corteza retrosplenial forma parte de la región del cíngulo posterior. En cambio en la rata, la región del cíngulo posterior entera es designada como corteza retrosplenial (Vann y col. 2009). Una característica destacable de la corteza retrosplenial de rata es su tamaño, se extiende por más de la mitad de la longitud total del cerebro, lo cual la convierte en una de las mayores regiones corticales en esta especie.

Si bien poco se sabe acerca de la función de la corteza retrosplenial, sus conexiones señalan enseguida su posible rol en memoria. Estudios de seguimiento axonal en monos han revelado conexiones recíprocas con tres regiones distinguidas: la formación hipocampal, la región parahipocampal y un selecto núcleo talámico (Kobayashi y Amaral 2003; Kobayashi y Amaral 2007). Otra destacable conexión incluye vías recíprocas de la retrosplenial con partes de la corteza prefrontal, lo cual provee una vía indirecta para la influencia del hipocampo sobre la corteza prefrontal dorsolateral y viceversa (Morris y col. 1999).

La corteza retrosplenial en la rata está gobernada por conexiones recíprocas con el núcleo talámico anterior, el núcleo talámico dorsal lateral y la formación hipocampal

(Van Groen y Wyss 1990; Van Groen y Wyss 1992; Van Groen y Wyss 2003) (ver **Esquema I.6**). Cabe resaltar que tanto en el cerebro de roedor como en el de mono, la corteza retrosplenial provee una ruta recíproca e indirecta entre la formación hipocampal y el núcleo talámico anterior, a pesar de que estas regiones están comunicadas entre sí por una densa conexión directa. La importancia funcional de esta ruta indirecta se ve reflejada por estudios de desconexión que muestran que el núcleo talámico anterior, la corteza retrosplenial y el hipocampo requieren uno de otro para sustentar el aprendizaje espacial (Sutherland y Hoising 1993; Warburton y col. 2001).



Esquema I.6. Principales conexiones de la corteza retrosplenial en la rata. A la izquierda, las principales conexiones extrínsecas. A la derecha, las principales conexiones intrínsecas dentro de la corteza retrosplenial. AD, núcleo talámico dorsal anterior; AM, núcleo talámico medial anterior; AV, núcleo talámico ventral anterior; LD, núcleo talámico laterodorsal; LP, núcleo talámico lateroposterior; ParaS, parasubiculum; Post, postsubiculum; PreS, presubiculum; Sub, subiculum; los números hacen referencia a las designaciones de área.

Estas consideraciones plantean la importante cuestión de identificar aquellas conexiones de la corteza retrosplenial en memoria que no son compartidas ni con el hipocampo ni con el núcleo talámico anterior, lo cual sería clave para determinar su contribución “única” en el procesamiento de la memoria. Las conexiones candidatas no

compartidas con el hipocampo y núcleo talámico anterior incluyen conexiones recíprocas con áreas en la corteza prefrontal dorsolateral (Morris y col. 1999), lo cual provee una vía importante entre el hipocampo y regiones corticales involucradas en la función ejecutiva (planificación y secuenciación de acciones futuras, elegidas de entre múltiples opciones).

Tal vez lo más importante sea que la corteza retrosplenial recibe información sensorial elaborada más temprano que el hipocampo o el núcleo talámico anterior. Las entradas directas de V2 y V4, junto con las fibras aferentes del claustró y el núcleo talámico lateroposterior, podrían proporcionar información visual (Milner y Vogt 1984). También, la información sensorial puede ser transmitida a través de proyecciones de la corteza parietal directas a la corteza retrosplenial. Además, la corteza parietal tiene proyecciones especialmente densas hacia el cíngulo posterior (Kobayashi y Amaral 2003), que a su vez proyecta fuertemente hacia la corteza retrosplenial. Así, las zonas 29 y 30 podrían ser conductos vitales de la información sensorial (parietal y occipital) que llega tanto a la formación hipocámpal como al núcleo talámico anterior ayudando a la formación de la memoria.

Experimentos con lesiones en humanos (Valenstein y col. 1987; Maguire 2001) y roedores (Sutherland y col. 1988; Vann y Aggleton 2002; Vann y Aggleton 2004), así como datos anatómicos (Miller y Vogt 1984; Wyss y van Groen 1992; Burwell y Amaral; 1998) y funcionales (Cooper y Mizumori 2001; DeStrade y Ott 1982; Vanderwolf y col. 1985; Pan y McNaughton 1997; Vann y col. 2000; Albasseret y col. 2007), señalan que la corteza retrosplenial podría cooperar con el hipocampo en aprendizaje y memoria.

A pesar de las evidencias presentadas acerca de las conexiones y activación de la corteza retrosplenial que la vinculan con aprendizaje y memoria, ninguno de estos trabajos ha establecido el rol de esta estructura en la persistencia de la memoria ni los mecanismos moleculares que la subyacen, como tampoco el papel que podría estar desempeñando c-Fos en el mantenimiento de la traza mnésica.

Objetivos

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es comprender el rol de los procesos de síntesis de macromoléculas, específicamente la transcripción y la traducción de genes, en la persistencia de la MLT. Para ello, utilizamos como modelo un paradigma de aprendizaje aversivo en ratas, la evitación inhibitoria, el cual es fuertemente dependiente de la integridad funcional del hipocampo.

A partir de las evidencias presentadas en la introducción de este trabajo, y basándonos en trabajos previos de nuestro laboratorio estudiando los requerimientos moleculares y celulares del aprendizaje de EI, definimos los siguientes **objetivos particulares**:

- Establecer el requerimiento de síntesis de nuevos mensajeros en el hipocampo más allá de las 6 h luego del entrenamiento para la persistencia de la MLT.
- Estudiar el rol de c-Fos en la fase necesaria para persistencia de la MLT en el hipocampo.
- Determinar la suficiencia o no de c-Fos durante la fase dependiente de síntesis de nuevas proteínas necesaria para la persistencia de la MLT en el hipocampo.
- Identificar estructuras asociadas al hipocampo en el procesamiento de la MLT mediante la expresión diferencial de c-Fos.
- Establecer el requerimiento de síntesis de nuevos mensajeros y nuevas proteínas en la corteza retrosplenial luego del entrenamiento para la formación y persistencia de la MLT.
- Estudiar el rol de c-Fos en la formación y persistencia de la MLT en la corteza retrosplenial.

Materiales y Métodos

Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas Wistar machos (2-3 meses de edad; peso, 180-250 g) de nuestros propios bioterios. Los animales fueron mantenidos en jaulas en grupos de cinco, con agua y comida disponibles *ad libitum*, bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (encendiéndose la luz a las 7 de la mañana), a una temperatura constante de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Cirugía

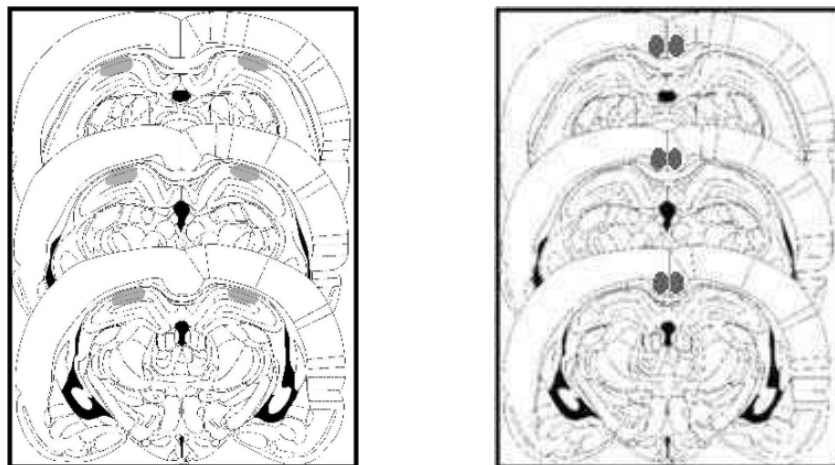
Los animales utilizados para los experimentos farmacológicos fueron sometidos a cirugía para la implantación de cánulas guía bilaterales, de un calibre de 0.7 mm (22G). La cirugía se realizó bajo anestesia con ketamina (0.4 mg/100 g) y xilacina (0.3 mg/100 g). Las cánulas guía fueron implantadas 1 mm sobre el área CA1 del hipocampo dorsal según las coordenadas del atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson 1997): anterior -4.3; lateral ± 4.0 ; ventral -2.4 (**Esquema II.1, izquierda**) o sobre la región dorsal de la corteza retrosplenial: anterior -4.3; lateral ± 0.5 ; ventral -1.2 (**Esquema II.1, derecha**), con respecto al bregma. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con acrílico dental (ver **Foto 1.1**). A fin de asegurar una completa recuperación de los animales, estos fueron utilizados para los diferentes procedimientos cuatro días luego de la cirugía.



Foto 1.1. Localización de las cánulas guía luego de la cirugía. Las cánulas fueron implantadas en la región CA1 del hipocampo dorsal en las coordenadas: anterior -4.3; lateral ± 4.0 ; ventral -2.4 según el atlas de Paxinos y Watson, 1997.

Localización de las cánulas

Se realizaron controles histológicos post-mortem de la ubicación de las cánulas. Uno o dos días luego de finalizados los procedimientos conductuales, se infundió 1 μ l de una solución al 4% de azul de metileno en solución salina a través de cada cánula y los animales fueron sacrificados por decapitación 15 minutos después. Los cerebros fueron incubados en formalina al menos por 72 horas y la localización de la cánula fue verificada mediante examinación histológica. La infusión se extendió en un radio de menos de 1.2 mm³ y fue correcta (dentro de 1 mm³ del sitio elegido para la infusión) en un 95% de los animales. Sólo los datos conductuales de los animales con la cánula correctamente localizada fueron incluidos para el análisis final (ver **Esquema II.1**).



Esquema II.1. Representación esquemática de secciones coronales de cerebro de rata en tres planos rostrocaudales (-3.80, -4.30 y -4.80 del bregma) tomados del atlas de Paxinos y Watson (1997). En gris se muestra el área aproximada a la que llegó la infusión en el hipocampo dorsal (*izquierda*) y corteza retrosplenial (*derecha*).

Infusión de drogas

En el momento de la administración de las drogas, la cánula de infusión (calibre 0.3 mm; 30G) fue introducida dentro de la cánula guía. La punta de la cánula de infusión sobresalía 1.0 mm de la cánula guía, dirigida al área CA1 del hipocampo dorsal o de la corteza retrosplenial. Los animales fueron cuidadosamente cubiertos con una manta dejando fuera sólo su cabeza para realizar el procedimiento de inyección. La manipulación fue realizada delicadamente para minimizar el estrés. El tiempo de este proceso fue el mismo para todos los grupos experimentales. El procedimiento completo de inyección tomó aproximadamente 3 minutos, incluyendo 30 segundos para la inyección en sí misma, primero en un lado y luego en el otro. Después de cada infusión se esperó un minuto para permitir la difusión de la droga y evitar el reflujo.

Drogas

El inhibidor de la transcripción, α -amanitina (Ama, 46 ng/1 μ l/lado, Sigma), fue disuelta en solución fisiológica.

Los oligonucleótidos (ODNs, Genbiotech S.R.L.) consistieron en secuencias de 15 bases que estaban fosforotioladas en las primeras y últimas 3 bases (“end-capped”). Esta modificación incrementa la estabilidad y disminuye la toxicidad de los compuestos. La secuencia del ODN del *c-fos* antisentido (ASO *c-fos*) fue 5'-GAA CAT CAT GGT CGT-3', y la del ODN del *c-fos* sin-sentido (MSO *c-fos*) fue 5'-GTA CCA ATC GGG ATT-3'; la secuencia del ODN del *zif268* antisentido (ASO *zif268*) fue 5'-GGT AGT TGT CCA TGG TGG-3', y la secuencia del ODN del *zif268* sin-sentido (MSO *zif268*) fue 5'-GTG TTC GGT AGG GTG TCA-3'. Todas las secuencias fueron sometidas a una búsqueda mediante el programa BLAST del NCBI utilizando la base de datos de Genbank. Las secuencias del ASO *c-fos* y del ASO *zif268* sólo presentaron homología

con las secuencias blanco en los ARNm de *c-fos* y *zif268*, respectivamente, y con ninguna otra de rata o humano. Los ODNs control, MSO *c-fos* y *zif268*, que contienen los mismos nucleótidos que el ASO pero ordenados al azar, no presentaron homología completa con ninguna secuencia de la base de datos. Todos los ODNs fueron disueltos en solución salina e inyectados a una dosis de 2 nmol/1 µl/lado.

La norepinefrina (NE, 0,3 µg/0,5 µl/lado, Sigma) fue disuelta en solución fisiológica.

El inhibidor de la traducción, anisomicina (Ani, 80 µg/0.8 µl/lado, Sigma), fue disuelto primero en HCl concentrado, luego se ajustó el pH de la solución a ~ 7.0 con NaOH concentrado y fue llevada a su concentración de uso con solución fisiológica.

El inhibidor de la traducción, emetina (Eme, 50 µg/1 µl/lado, Sigma), fue disuelto en solución fisiológica.

Procedimientos conductuales

Entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria (EI)

Para el entrenamiento en la tarea de EI las ratas se colocaron sobre una plataforma de 8 cm., elevada 5 cm., y localizada a la izquierda del aparato de entrenamiento. El piso del aparato consiste en una serie de barras de bronce de 0.2 cm. de calibre, espaciadas 1.0 cm (ver **Foto 1.2**). Se cuantificó la latencia de las ratas previo al descenso de la plataforma con las cuatro patas sobre la grilla. En la sesión de entrenamiento, inmediatamente después de bajar de la plataforma, los animales recibieron una descarga de 0.3 mA (entrenamiento suave) o de 0.7 mA (entrenamiento fuerte) en las patas durante 3 segundos. Este grupo se ha denominado “**grupo entrenado**”.



Foto 1.2. Caja de entrenamiento de EI. Se observa una rata sobre la plataforma elevada por encima de la grilla de varillas de bronce. Durante la sesión de entrenamiento, el animal explora la plataforma por unos segundos y eventualmente baja a la grilla donde recibe un shock en las patas. En la sesión de testeo, la rata es colocada nuevamente sobre la plataforma y se evalúa la retención de la memoria como el tiempo que tarda el animal en descender a la grilla.

Para los experimentos conductuales, en la sesión de testeo realizada 2 o 7 días (MLT) luego del entrenamiento, el procedimiento fue similar, excepto que la descarga eléctrica fue omitida. Se consideró que los animales habían aprendido la tarea cuando la latencia a descender de la plataforma en la sesión de testeo fue significativamente mayor a la latencia durante la sesión de entrenamiento. Esto es interpretado como una evitación del animal a descender, eludiendo así la llegada del estímulo aversivo e inhibiendo, por lo tanto, un comportamiento exploratorio innato de esta especie en un ambiente novedoso.

Para algunos de los ensayos bioquímicos se utilizó, a su vez, un grupo de animales control que se colocaron directamente sobre la grilla y recibieron inmediatamente después una descarga eléctrica de 0.7 mA, durante 3.0 segundos en las patas (“**grupo shock**”). Este grupo recibió una descarga de igual duración e intensidad

que el grupo entrenado pero no aprendió a asociar la bajada de la plataforma con el estímulo aversivo (ver caja entrenamiento de EI). El tiempo que estos animales permanecieron en la caja de entrenamiento fue similar al del grupo entrenado.

Prueba de actividad locomotora y exploratoria: campo abierto

El campo abierto es un test utilizado habitualmente en roedores para evaluar actividad locomotora y exploratoria (Viola y col. 2000). El dispositivo consiste en una caja de 50 cm x 50 cm de ancho con el piso color negro, dividido en 9 cuadrantes iguales (aprox. 16,7 cm por lado cada uno). Las paredes son negras y alcanzan una altura de 40 cm (Foto 1.3). Al comienzo del ensayo, se colocó a la rata en un cuadrante perimetral y se registró la actividad locomotora y exploratoria durante 5 minutos. El registro consiste en medir la cantidad de veces que el animal cruza los cuadrantes y el número de episodios en los que hace “*rearings*” (posición vertical que adopta el roedor apoyándose sobre sus patas traseras, con la que examina el ambiente). El grado de habituación del animal al campo abierto se considera inverso al de exploración.

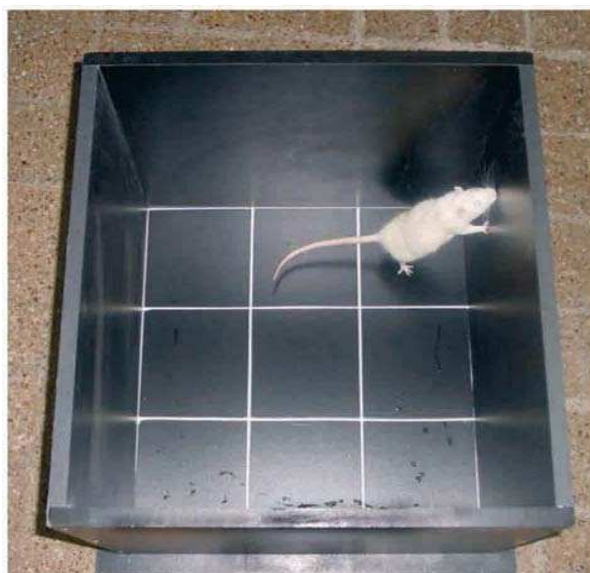


Foto 1.3. Se observa una rata explorando el campo abierto. La actividad exploratoria basal se determinó registrando el número de cruces y de “*rearings*” que realizó cada animal durante una sesión de 5 minutos en el campo abierto.

Prueba de estado de “ansiedad”: laberinto elevado en forma de cruz

El laberinto elevado en forma de cruz es un test ampliamente utilizado que permite evaluar el estado de ansiedad de los roedores. El dispositivo es una construcción de madera elevada 50 cm del suelo. Tiene dos ramas abiertas de 50 cm x 10 cm y dos cerradas de 50 cm x 10 cm x 40 cm, sin techo, y está diseñada de tal modo que tanto las ramas abiertas como las cerradas quedan opuestas (ver **Foto 1.4**). Durante la prueba, el observador se ubicó a 1,5 m del laberinto. Al comienzo del ensayo se colocó a la rata en el centro del laberinto enfrentando una rama abierta y se la observó durante 5 minutos de exploración libre. Se evaluó la cantidad de veces que el animal entró a las ramas abiertas, la cantidad total de entradas (independientemente de la rama) y el tiempo total que permaneció en las ramas abiertas. Habitualmente, las ratas permanecen menos tiempo en las ramas abiertas que en las cerradas y entran menor cantidad de veces a las ramas abiertas. Se asume que las ramas abiertas del laberinto combinan el miedo que provoca un espacio abierto y nuevo con el miedo de balancearse sobre una plataforma elevada y relativamente estrecha. Por el contrario, las ramas cerradas tienen paredes altas, formando un estrecho pasillo que brinda la sensación de protección frente a potenciales predadores (posiblemente estos miedos sean similares a lo que en seres humanos se conoce como agorafobia y vértigo). El uso de este test fue validado fisiológica, farmacológica y comportamentalmente (Pellow y col. 1985; Dawson y col. 1995). Una conducta ansiogénica se evidencia por una disminución del porcentaje de entrada a ramas abiertas y/o del tiempo de permanencia en ellas. Por el contrario, una conducta de menor ansiedad refleja mayor exploración a los espacios abiertos.



Foto 1.4. Una rata en el laberinto elevado en forma de cruz. Se determinó el nivel de ansiedad registrando el número de entradas a los brazos cerrados o a los brazos abiertos del laberinto y el tiempo que el animal transcurrió en cada compartimento.

Ensayos bioquímicos

Para los ensayos bioquímicos, fueron sacrificados animales de los grupos entrenado, shock y naïve a diferentes tiempos, luego de los procedimientos conductuales. En este último grupo, los animales fueron retirados de la caja donde se los mantiene y sacrificados a los mismos tiempos que a los animales de los otros grupos, sin haber sido sometidos a ninguno de los procedimientos conductuales. Después de que los animales fueron sacrificados por decapitación, se removió el cerebro y se disecaron, congelaron y almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ los hipocampos y las secciones dorsales de la corteza retrosplenial hasta su utilización.

Obtención de homogenatos y fracciones nucleares

Los hipocampos fueron homogeneizados en buffer de homogeneización a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ [20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 0.32 M sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF,

10 µg/ml aprotinina, 15 µg/ml leupeptina, 50 mM fluoruro de sodio (NaF), y 1 mM ortovanadato de sodio (Na₃VO₄)]. A esta fracción celular se la denominó homogenato. Para la preparación de fracciones nucleares, los homogenatos fueron centrifugados 10 minutos a 900 G y el pellet obtenido fue resuspendido en buffer de resuspensión (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 15 µg/ml leupeptina, 50 mM NaF, y 1 mM Na₃VO₄). Todos los procedimientos fueron realizados a 4 °C. Las muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta su utilización. En los experimentos donde sólo se evalúa el área del hipocampo dorsal que rodea el sitio de infusión de una droga, se tomaron rebanadas de 3 mm de espesor a partir del área donde se localizan las cánulas, y se utilizaron volúmenes de homogeneización acordes al peso de la sección.

Ensayos de Western Blot

Las muestras de homogenato (10-30 µg de proteína, determinado por el método de Bradford) o de fracciones nucleares (30 µg de proteína) fueron sometidas, por duplicado, a una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE; geles al 10 %) y, luego, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente (14 horas, 40 V a 4 °C) a membranas de PVDF. Luego de una preincubación en buffer de bloqueo (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 10 % leche en polvo, 150 mM NaCl, 0.05 % v/v Tween 20), estas membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) o toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-actina (1:8000; SCBT); anti c-Fos (1:1000; SCBT); anti-Zif268 (1:2000, SCBT). SCBT: Santa Cruz Biotechnology.

Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 15 minutos en buffer TTBS (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % v/v Tween 20) y luego incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-cabra acoplados a peroxidasa

de rabanito (1:10000, Bio Rad; 1:10000, SCBT) durante 40 minutos a 2 horas a TA. Luego de esta incubación, las membranas fueron nuevamente lavadas en buffer TTBS 3 veces durante 15 minutos. Finalmente, se visualizaron los complejos antígeno-anticuerpo por un método de quimioluminiscencia (NEN). El análisis densitométrico de las películas radiográficas fue realizado en un sistema de análisis de imágenes MCID (5.02v, Imaging Research Inc.). Los inmunoblots fueron revelados de modo tal que fueran lineales en el rango utilizado para la densitometría.

Remoción de anticuerpos para re-incubación

Para remover los anticuerpos, las membranas fueron incubadas durante 120 minutos en buffer de remoción (8 mM Tris-HCl, 7 mM SDS, 0.5 M NaCl, 100 mM Urea, pH: 4.5) a 65 °C con agitación en un baño termostático. Luego, las membranas fueron lavadas en agua destilada 4 veces durante 15 minutos, secadas a TA y almacenadas a 4 °C hasta su re-incubación.

Ensayos inmunohistoquímicos

Para el análisis de difusión de los oligonucléotidos (ODN) luego de la infusión, las animales fueron infundidos con 2 nmol/μl (1μl/lado) de ODN antisentido de *c-fos* (ASO *c-fos*) biotinilados, y luego de 2, 5 o 24 horas, fueron anestesiados y perfundidos intracardiamente con solución salina al 0,9 %, seguido de paraformaldehído 4 %. Posteriormente, los cerebros fueron removidos, y luego de un pasaje por sacarosa 10 % en PBS, fueron transferidos a sacarosa 30 % en PBS para brindar crioprotección al momento de ser cortados en el criostato en rebanadas de 50 μm. La detección del ASO fue realizada mediante la tinción de avidina-biotina.

Para la inmunohistoquímica de c-Fos, animales de los grupos entrenado, shock y naïve, fueron anestesiados a distintos tiempos luego del entrenamiento y perfundidos intracardiamente con solución salina 0,9 %, seguido de paraformaldehído 4 %. A continuación, los cerebros fueron removidos y colocados en viales con la misma solución fijadora durante 2-4 horas. Posteriormente, fueron transferidos a sacarosa 10%, y por último, a sacarosa 30 % un día antes de ser cortados en crióstato de congelación. Se colectaron cortes coronales de 50 µm en PBS 0,1M con azida sódica 0.005 % hasta ser sometidos al protocolo de inmunohistoquímica. Los cortes fueron incubados con anticuerpo primario anti-c-Fos (1:2.000, SCBT). Los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados mediante uso del anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (Jackson ImmunoResearch Inc), que luego de ser incubado con el complejo avidina-peroxidasa (ABC kit, Vectastain elite, Vector Laboratories), fue revelado con DAB (DAB Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories). Posteriormente, los cortes fueron montados en portaobjetos, para la posterior captura de imágenes fotográficas utilizando el fotomicroscopio Zeiss AXIOPHOT.

Análisis de datos

Los datos de comportamiento fueron analizados mediante un test de *Student* no pareado o por ANOVA de una vía seguida de un test de *Newman-Keuls*. Los datos de Western Blot fueron analizados mediante un test de *Student* no pareado o ANOVA de una vía seguida de un test de *Newman-Keuls* de comparaciones múltiples.

Resultados

Capítulo I.

Rol de la expresión de c-Fos en el hipocampo en el mantenimiento de una memoria duradera

I. 1. La persistencia de la memoria de largo término requiere de síntesis tardía de mensajeros en el hipocampo.

Con el objetivo de investigar si existe una o más ondas de síntesis de mensajeros involucrada en el almacenamiento de una memoria duradera, utilizamos la tarea de Evitación Inhibitoria (EI) de un solo ensayo (**Figura 1**). Esta tarea ha sido ampliamente utilizada para el estudio del procesamiento de la memoria luego del aprendizaje por su rápida adquisición, la cual es dependiente de hipocampo así como la evocación de la misma (Izquierdo y col. 1997).

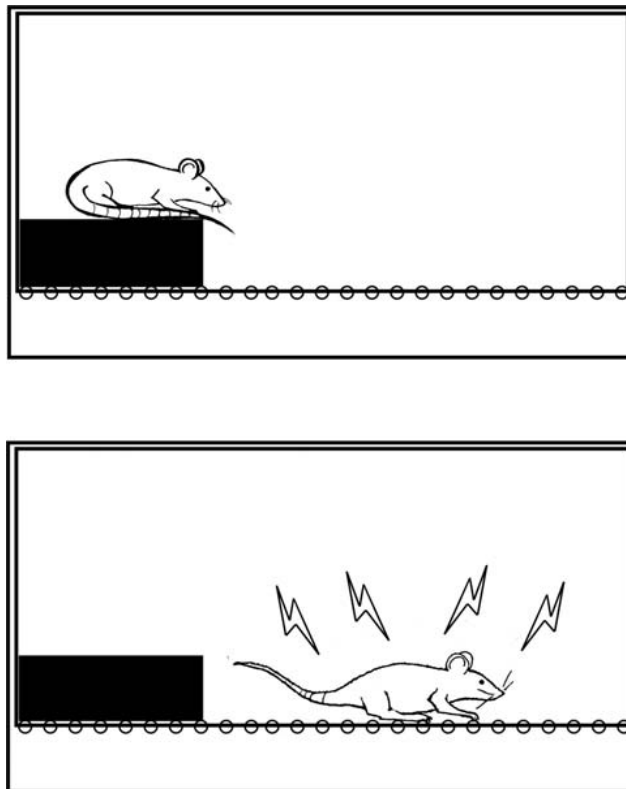


Figura 1. Aprendizaje de evitación inhibitoria (EI). Este entrenamiento dura sólo unos segundos y genera una memoria robusta cuya evocación es dependiente del hipocampo. Durante la sesión de entrenamiento, la rata es colocada en la plataforma y la explora por algunos segundos. Luego el animal desciende a la grilla donde recibe un shock eléctrico moderado en las patas. Durante la sesión de testeo (en este trabajo 2 o 7 días después del entrenamiento), el animal es colocado nuevamente sobre la plataforma y se mide el tiempo que tarda en descender a la grilla.

Para estudiar el rol de la transcripción en el hipocampo, infundimos dentro de la región CA1 dorsal un inhibidor específico de la ARN polimerasa II, α -amanitina, a distintos tiempos luego del entrenamiento de EI, en una dosis que se sabe interfiere con la formación de la memoria (Duvarci y col. 2008; Igaz y col. 2002). Como se muestra en la **figura 2**, la infusión de α -amanitina 24 horas luego del entrenamiento perjudica la retención de la memoria a los 7 días ($p < 0,005$ con respecto a los animales inyectados con vehículo, $n = 12$) dejando intacta la retención a los 2 días. Sin embargo, no se observaron cambios en la retención de la memoria, a los 2 o a los 7 días, cuando se infundió α -amanitina a 9, 12, 18 o 36 horas luego del entrenamiento con respecto a los animales infundidos con vehículo. Esto sugiere que la amnesia inducida por la droga no afecta la evocación de la memoria ni tiene efectos inespecíficos sobre el comportamiento. Estos hallazgos indican que se requiere una onda de síntesis de ARNm tardía en el hipocampo dorsal para el mantenimiento de una memoria de EI persistente, pero no para su formación.

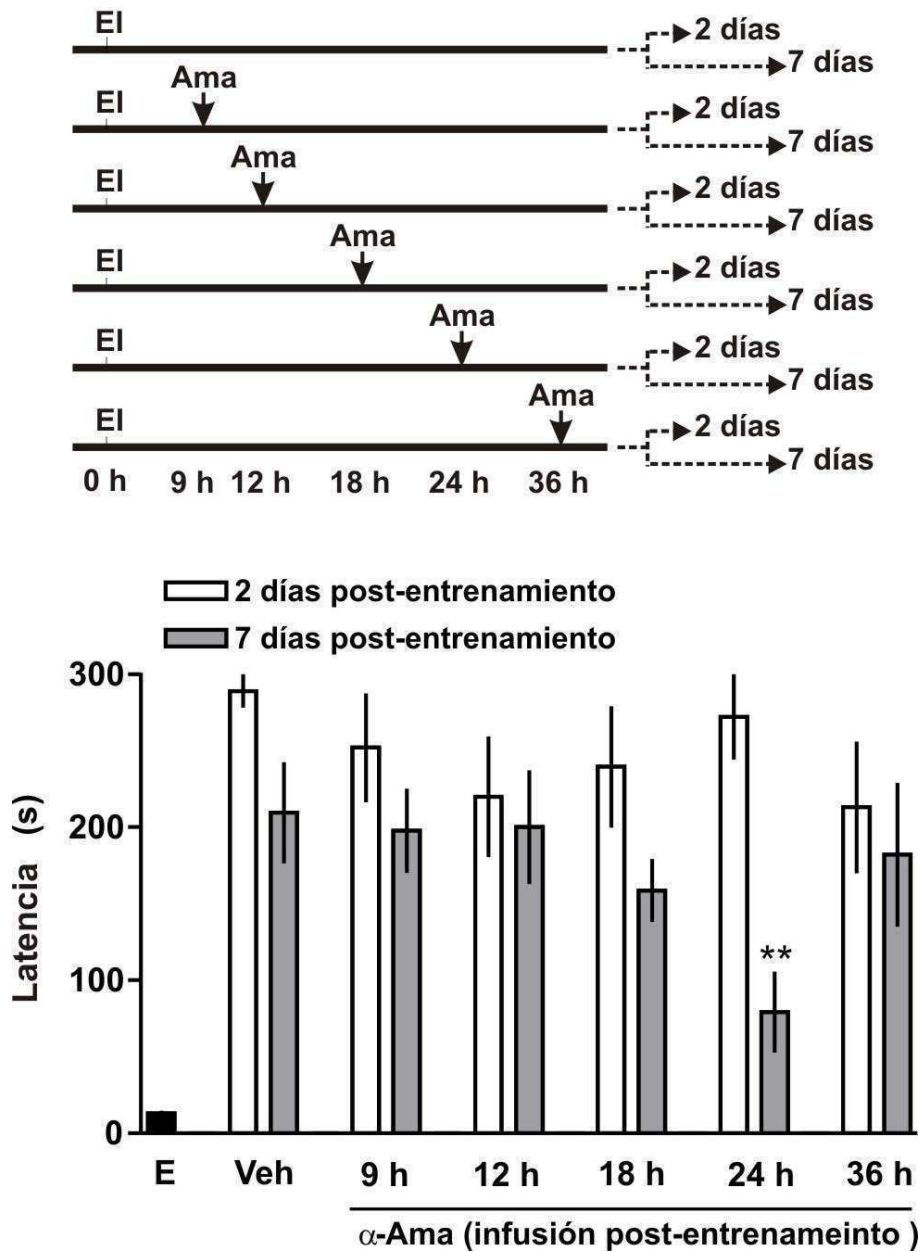


Figura 2. La inhibición de la transcripción en el hipocampo 24 horas luego del entrenamiento afecta la persistencia de la memoria, pero no su formación. La infusión de α -amanitina -inhibidor de la transcripción- en el hipocampo 24 hs luego del entrenamiento produce amnesia en un test realizado a los siete días, pero no a los dos días del aprendizaje. La inhibición de la síntesis de mensajeros a 9, 12, 18, 24 o 36 hs no produce una disminución en la retención de la memoria de dos ni de siete días. Los datos están expresados como media \pm SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E) o la sesión de test (**) $p < 0.01$ respecto al grupo Vehículo (Veh). Test de *Student*, $n = 8-10$ por grupo.

I. 2. La persistencia de la memoria está asociada a dos ondas de expresión de c-Fos en el hipocampo.

Previamente, nuestro laboratorio ha demostrado el incremento en los niveles de c-Fos 24 horas luego de la tarea de EI (Igaz y col. 2004). Dicho aumento, es bloqueado por el uso de inhibidores de síntesis proteica y por bloqueantes de expresión y actividad de BDNF, administrados dentro de una ventana temporal específica, asociada a la perdurabilidad de la memoria (Bekinschtein y col. 2007; Bekinschtein y col. 2008). Entonces, nos preguntamos si el aumento tardío de la expresión de c-Fos podría estar asociado al mecanismo dependiente de transcripción involucrado en la persistencia de MLT.

Para determinar el curso temporal de los cambios de expresión de c-Fos asociados a la tarea de EI, medimos los niveles de la proteína c-Fos a diferentes tiempos luego del entrenamiento. Como se muestra en la **figura 3**, 2 ondas de expresión de c-Fos están asociadas con las memorias persistentes; una onda temprana y breve, alrededor de 1 hora luego del entrenamiento y una segunda onda de aumento de expresión a las 18-24 horas ($p < 0,05$ comparado con los valores del grupo naïve, $n = 5-10$). Es interesante resaltar que la segunda onda también es transitoria ya que no se observan cambios respecto al control en la medición a las 30 horas. No se observaron diferencias entre el grupo naïve y el grupo no entrenado que sólo recibió shock (datos no mostrados).

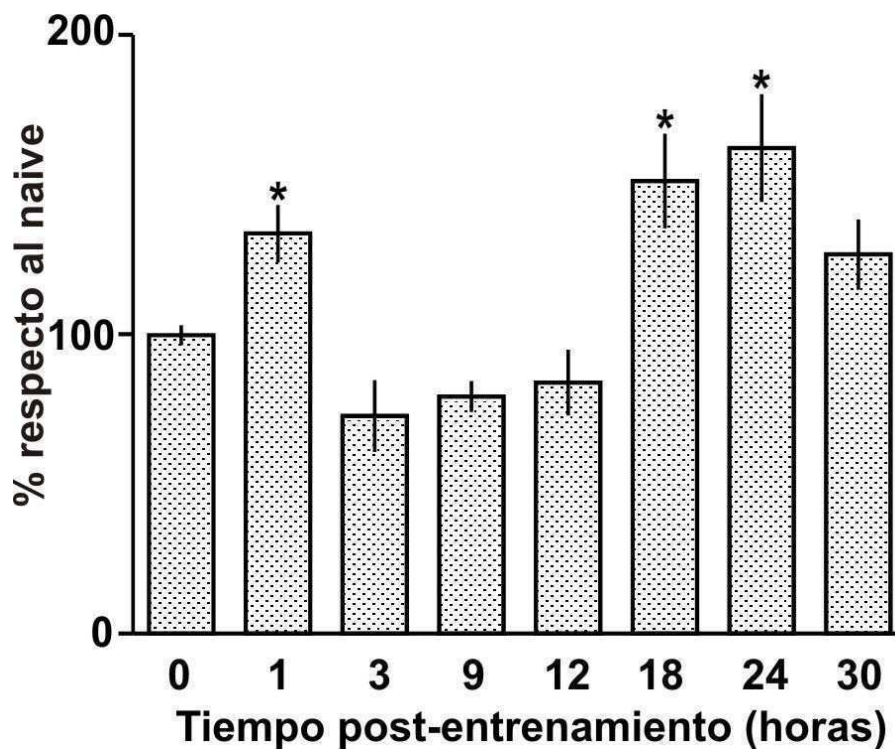


Figura 3. Curso temporal de los cambios en los niveles de c-Fos en el hipocampo de ratas entrenadas en la tarea de EI. Ratas entrenadas fueron sacrificadas inmediatamente, 1, 3, 9, 12, 18, 24, 30 y 72 horas luego del procedimiento conductual, sus hipocampos fueron disecados y homogeneizados para realizar ensayos de Western blot con anticuerpos específicos contra la proteína c-Fos. Las barras indican el porcentaje de cambio en el grupo E respecto del grupo naïve para cada punto en el tiempo. Los datos están expresados como medias \pm SEM. * $p < 0.05$, test de *Student*, $n = 5-8$ por grupo.

Posteriormente, inferimos que la segunda onda de expresión de c-Fos estaba principalmente involucrada en el proceso de persistencia de la memoria. Partiendo de esta premisa, es decir, si la onda tardía de expresión de c-Fos se requiere específicamente para el mantenimiento de una MLT duradera, entonces esta onda no debería verse luego de una sesión de entrenamiento que no produce una traza de memoria que persiste por muchos días. Modificando la cantidad o intensidad del entrenamiento se pueden producir MLT de diferente duración (**Figura 4**).

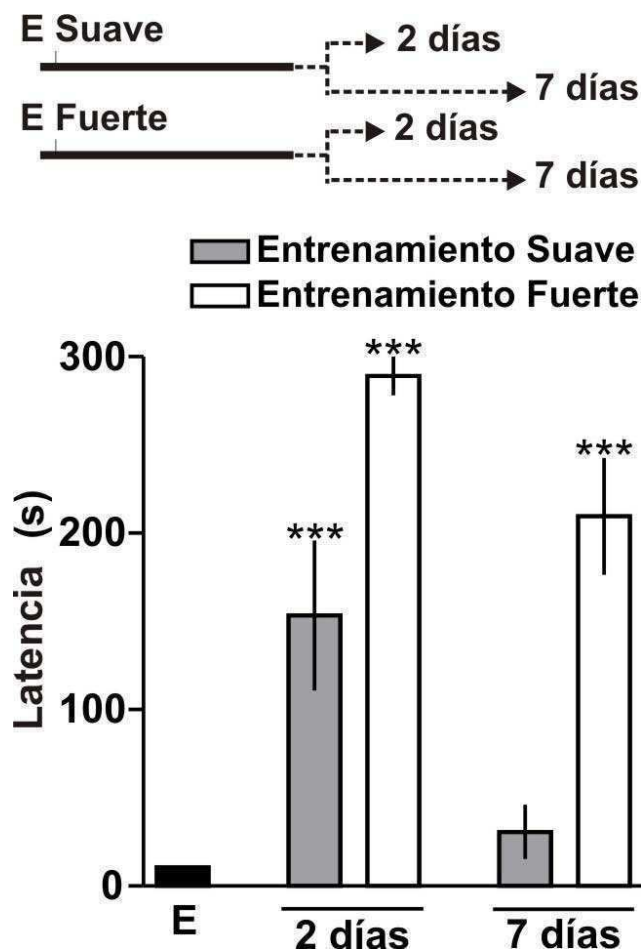


Figura 4. Un shock fuerte, pero no uno suave, durante el entrenamiento de EI genera una memoria que persiste por al menos 7 días. La administración de un shock de 0.7 mA durante 3 segundos, pero no uno de 0.3 mA de 3 segundos genera una memoria que dura al menos 7 días. Los datos están expresados como la media \pm SEM de las latencias de la sesión de entrenamiento (E, barras negras) o las de la sesión de test para un entrenamiento fuerte (barras blancas) o suave (barras grises) a 2 o 7 días del entrenamiento. *** $p < 0.001$ vs. E; test de *Student*, $n = 8-10$ por grupo.

En este marco, usando un entrenamiento de shock fuerte, el cual genera una memoria duradera testeada a los 7 días luego del entrenamiento (0,7 mA, 3 seg.; **Figura 4**), observamos que la expresión de c-Fos en hipocampo dorsal aumenta 24 horas luego entrenamiento ($p < 0,01$ comparado con el grupo naïve, *Newman-Keuls* después de ANOVA, $n = 6$, **Figura 5**). Sin embargo, entrenando con un shock leve (0,3 mA, 3 seg;

entrenamiento suave) que produce una MLT que decae más allá de los 3 días (**Figura 4**), no cambian los niveles de c-Fos a las 24 horas del entrenamiento (**Figura 5**). Por el contrario, tanto el entrenamiento fuerte como el suave inducen la primera onda de expresión de c-Fos 1 hora luego del entrenamiento ($p < 0,05$, Newman-Keuls después de ANOVA, $n = 6$, **Figura 5**).

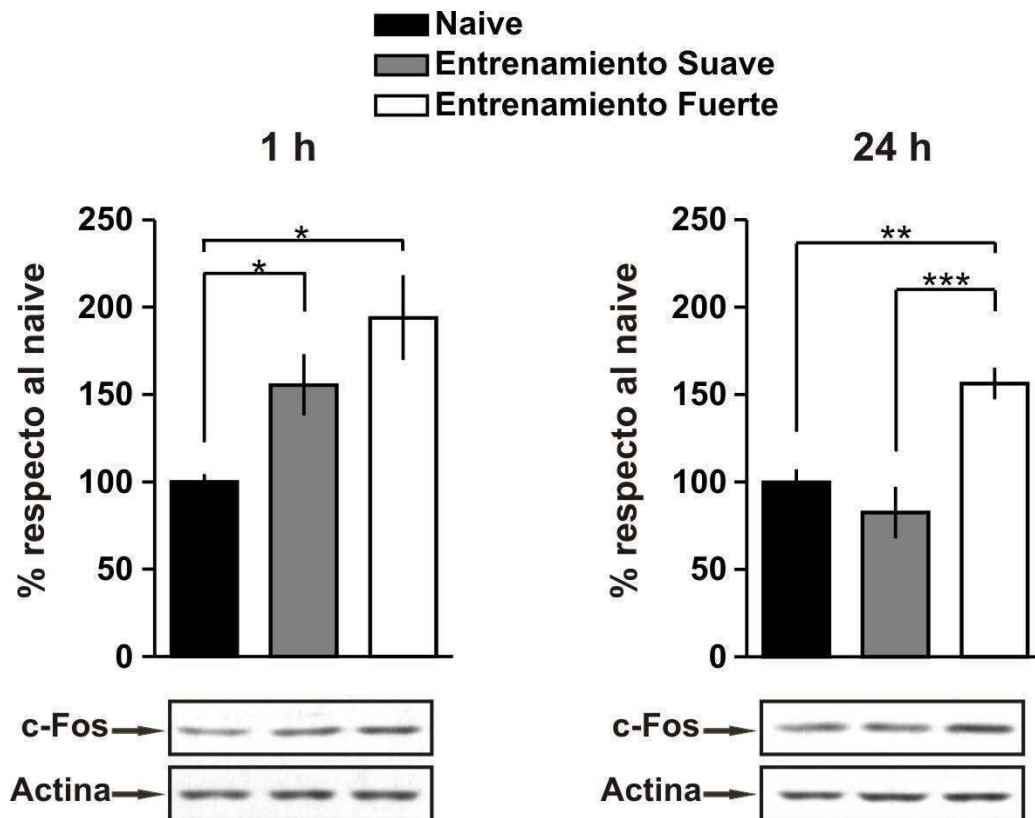


Figura 5. La expresión tardía de c-Fos está asociada con un entrenamiento fuerte de EI. El entrenamiento fuerte y el suave inducen el primer pico en los niveles de c-Fos 1 hora después del entrenamiento. Por el contrario, sólo el entrenamiento fuerte de EI está asociado con el aumento de los niveles de c-Fos a las 24 horas post-entrenamiento. Las barras muestran el porcentaje normalizado de los niveles medios de c-Fos con respecto al grupo naïve. Los datos están expresados como la media \pm SEM de los naïve (barras negras), entrenamiento en EI suave (barras grises) y fuerte (barras blancas). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; vs. naïve en el test *Newman-Keuls* después de ANOVA, $n = 6$. (Abajo) Western blots representativos mostrando los niveles de c-Fos y Actina.

Estos resultados indican que ambas MLT, las duraderas y las que no duran, están asociadas a una fase temprana de expresión de c-Fos, mientras que la fase tardía de expresión de c-Fos está correlacionada específicamente al almacenamiento duradero de una MLT.

Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica, confirmamos el aumento de la expresión de c-Fos en animales sometidos a un entrenamiento fuerte de EI, luego de 24 horas de realizado el entrenamiento (**Figura 6**). Este aumento no se observa en animales que recibieron un entrenamiento suave o que recibieron sólo un shock.

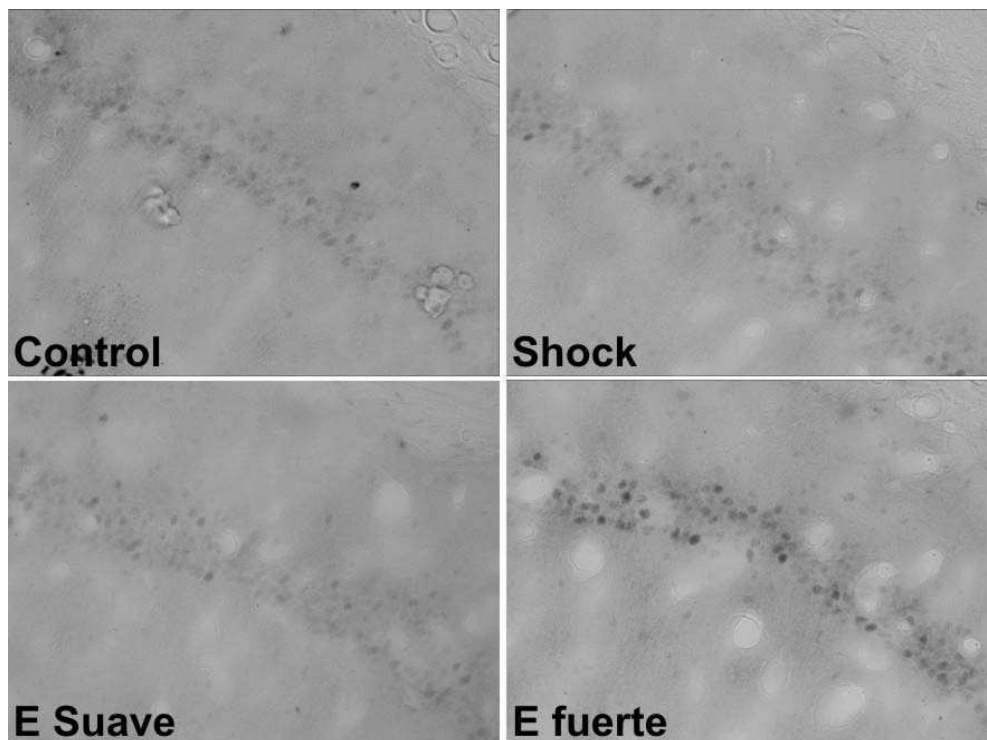


Figura 6. El entrenamiento fuerte de EI, pero no el suave, está asociado con un aumento en la inmunorreactividad de c-Fos en CA1 dorsal 24 horas luego del entrenamiento. Animales sometidos a la tarea de EI fuerte y suave, o que sólo recibieron el shock, fueron anestesiados 24 horas después del entrenamiento para ser perfundidos y fijados con paraformaldehído. Se realizaron cortes de 50 μ m de los cerebros extraídos, que luego fueron sometidos a ensayos de inmunohistoquímica para la detección de c-Fos.

I. 3. La persistencia de la memoria requiere una onda de expresión tardía de c-Fos en el hipocampo.

A pesar de que los experimentos mostrados anteriormente indican que una fase tardía de transcripción está asociada al mantenimiento de la MLT y que la expresión de c-Fos en el hipocampo aumenta tardíamente luego del entrenamiento fuerte, esto no es suficiente para responder si se requiere efectivamente de la expresión de c-Fos para la persistencia de la memoria. Para responder este interrogante, utilizamos un oligonucleótido antisentido (ASO) que bloquea específicamente la expresión *de novo* de c-Fos por unirse a su ARNm (Dragunow y col. 1993).

En la primera serie de experimentos, determinamos el grado de difusión y estabilidad del oligonucleótido antisentido de *c-fos*. Los animales fueron infundidos dentro de la región CA1 del hipocampo dorsal con 2 nmol del ASO *c-fos* biotinilado y sacrificados 2, 5 y 24 horas luego de la infusión. En la **figura 7** podemos observar la amplia difusión del ASO *c-fos* luego de 2 horas de realizada la infusión, permaneciendo detectable al menos por 5 horas. No quedaron huellas de la infusión del ASO de *c-fos* luego de transcurridas 24 horas (**Figura 7**).

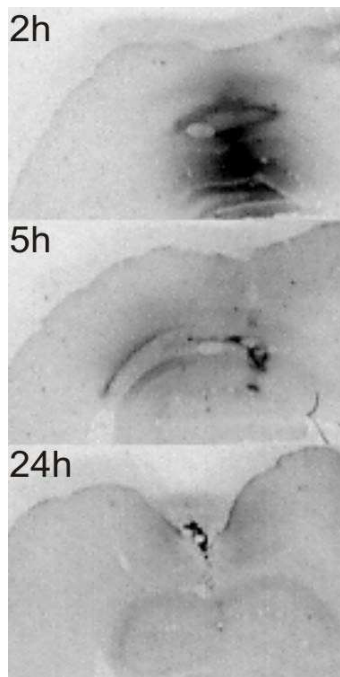


Figura 7. Distribución y concentración relativa de un oligonucleótido antisentido de *c-fos* (ASO *c-fos*) biotinilado a distintos tiempos luego de la infusión en el hipocampo. Fueron inyectados 2 nmol (1 μ l) de ASO *c-fos* en la región CA1 del hipocampo dorsal y las ratas fueron sacrificadas 2, 5 o 24 horas luego de la infusión. A las 2 horas, el oligonucleótido había difundido extensivamente en el hipocampo dorsal y un poco en la corteza subyacente. A las 5 horas la marca disminuye considerablemente y luego de 24 horas, el oligonucleótido deja de ser detectable en el hipocampo.

Posteriormente, procedimos a evaluar la efectividad del ASO *c-fos* para disminuir los niveles de expresión de la proteína inducidos por un entrenamiento de EI fuerte. La infusión del ASO *c-fos* (2 nmol/1 μ l/lado) dentro de la región CA1 del hipocampo dorsal 12 horas luego del entrenamiento de EI impide el aumento de c-Fos inducido por el aprendizaje a las 24 horas del entrenamiento (**Figura 8**, $p < 0,05$ comparado con el grupo naïve o con el grupo infundido con oligonucleótido sin sentido (MSO), *Newman-Keuls* después de ANOVA, $n=6$ por grupo). Por el contrario, no se observaron efectos sobre la expresión de c-Fos usando MSO *c-fos*. Dicho oligonucleótido control posee la misma secuencia que el ASO pero en un orden diferente.

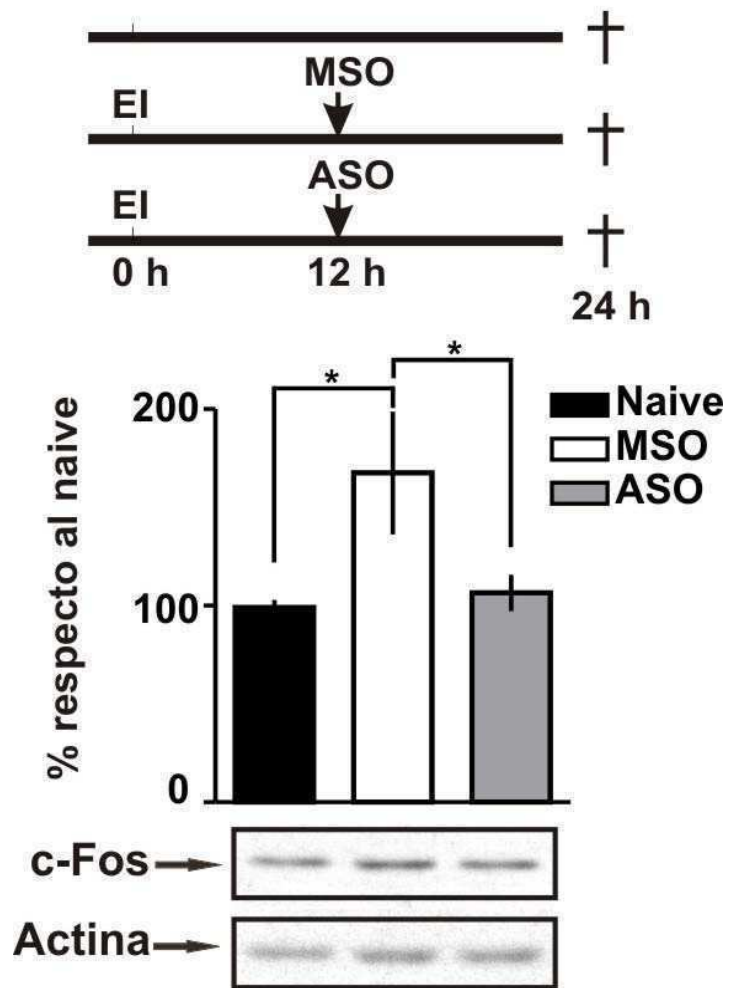


Figura 8. La infusión de ASO *c-fos* en la región CA1 del hipocampo dorsal 12 horas post-entrenamiento bloquea el aumento de *c-Fos* inducido por el **aprendizaje**. Los animales fueron infundidos en el hipocampo dorsal con MSO (barras blancas) o ASO (barras grises) 12 horas después del entrenamiento. A las 24 horas del entrenamiento, se disecó el hipocampo dorsal para ser utilizado en ensayos de Western blot, realizado con anticuerpos específicos contra *c-Fos* y Actina (blots representativos, abajo). Las barras muestran el porcentaje de los niveles normalizados respecto de los animales naïves. *, $p < 0.05$ en el test *Newman-Keuls* después de ANOVA, $n = 6$.

Estos hallazgos muestran que una única infusión del ASO *c-fos* dentro del hipocampo puede resultar efectiva en el bloqueo de la expresión *de novo* de *c-Fos* inducida por el entrenamiento fuerte.

Estos resultados nos llevaron a estudiar si la inhibición de la expresión tardía de c-Fos en el hipocampo dorsal sería suficiente para bloquear la persistencia de la memoria. Primero, como control, confirmamos y ampliamos hallazgos previos, mostrando que la infusión intra-CA1 del ASO *c-fos*, pero no la del MSO *c-fos*, 4 horas antes del entrenamiento previene la primera onda de expresión c-Fos inducida por el entrenamiento de EI y también impide la formación de dicha memoria. Estos resultados se pueden observar en las sesiones de testeo realizadas a los 2 y a los 7 días luego del entrenamiento (cada animal fue testeado solo una vez, **Figura 9**). Al día siguiente de la sesión de testeo (día 8), las ratas infundidas previamente con el ASO fueron sometidas nuevamente a un protocolo de entrenamiento fuerte de EI y testeada a las 24 horas. Las latencias de retención exhibidas por estos animales, fueron similares a las latencias de los animales control a los 2 días del entrenamiento original (**Figura 9**). Estos resultados sugieren que la infusión del ASO *c-fos* previene efectivamente la formación de la memoria de EI sin producir ningún déficit de larga duración en la adquisición del aprendizaje ni en la evocación de la memoria.

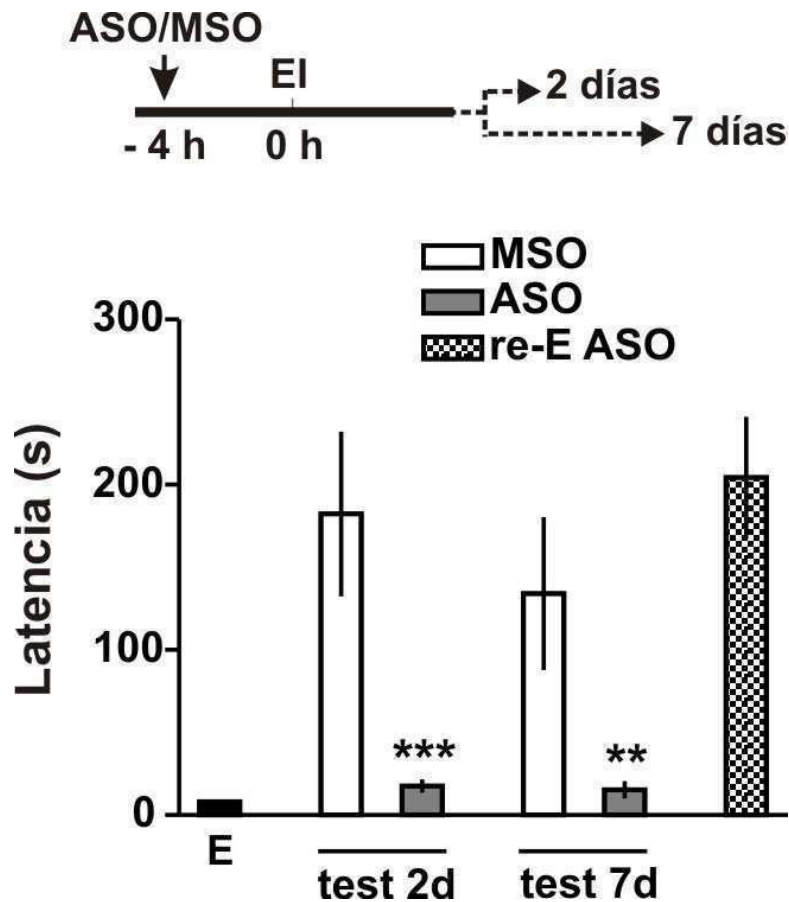


Figura 9. La expresión temprana de c-Fos en el hipocampo es necesaria para la formación de la memoria. La infusión de oligonucleótidos anti-sentido de *c-fos* (ASO *c-fos*), pero no de los oligonucleótidos sin sentido (MSO), 4 horas antes del entrenamiento de EI, produce amnesia de 2 y de 7 días. Sin embargo estos animales al ser re-entrenados en la tarea (re-E ASO) son capaces de aprender normalmente. Los datos están expresados como media \pm SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E) o la sesión de test, *** $p < 0.001$, ASO vs MSO a los dos días; ** $p < 0.01$, ASO vs MSO a los siete días; test de *Student*, $n = 8-10$ por grupo.

Posteriormente, procedimos a realizar una curva temporal del efecto del ASO *c-fos* sobre la memoria. En la **figura 10** podemos observar que la infusión del ASO *c-fos* en el hipocampo dorsal 12 horas después del entrenamiento de EI, no afecta la retención de la memoria a los 2 días, pero a los 7 días la MLT se ve significativamente perjudicada (barras grises, $t = 3,3$, $p < 0,003$, $n = 12$ por grupo). Estos resultados indican

que la persistencia de la memoria, pero no su formación, es afectada por la inhibición de la segunda onda de expresión de c-Fos. Es importante resaltar que no se observaron efectos sobre la formación (2 días) ni sobre la retención (7 días) de la memoria cuando el ASO *c-fos* fue infundido en CA1 8, 18 o 24 después del entrenamiento (**Figura 10**).

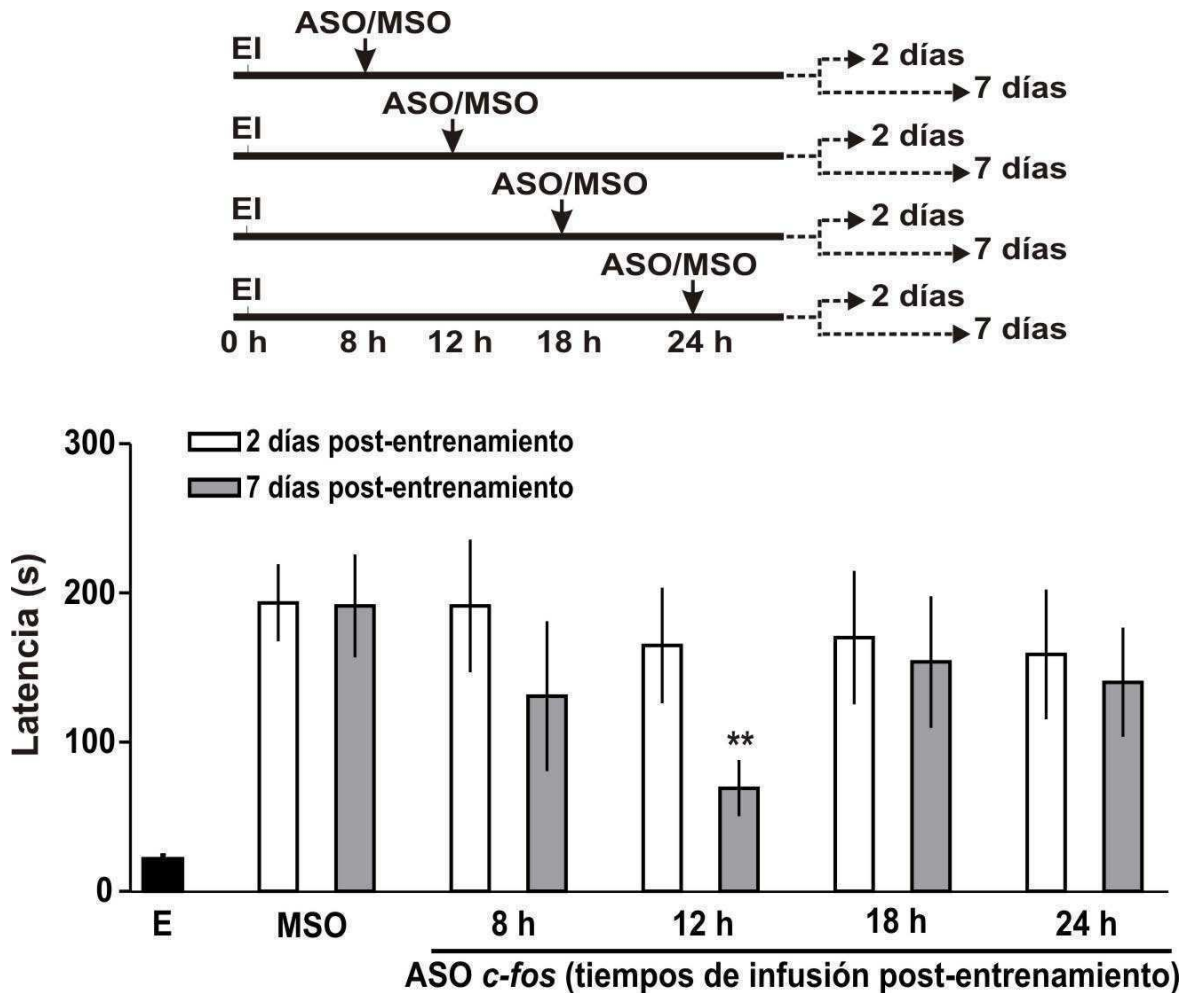


Figura 10. La expresión tardía de c-Fos en el hipocampo es necesaria para la persistencia de la memoria, pero no para su formación. La infusión de oligonucleótidos anti-sentido de *c-fos* (ASO), pero no de los oligonucleótidos sin sentido (MSO), 12 horas luego del entrenamiento de EI, produce amnesia a los 7 días, pero no a los 2 días. Las infusiones realizadas a 8, 18 o 24 horas no tuvieron efectos sobre la retención a los 2 ni a los 7 días. Los datos están expresados como Media \pm SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E) o la sesión de test, ** $p < 0.01$, ASO vs MSO a los 7 días; test de *Student*, $n = 8-10$ por grupo.

Asimismo, podemos observar que los animales que recibieron una infusión de ASO *c-fos* intra-hipocampal 12 horas luego del entrenamiento y se mostraron amnésicos en la sesión de testeo realizada a los 7 días, también mostraron déficit de memoria al ser re-testeados a los 14 días del entrenamiento (**Figura 11**). Estos resultados muestran ausencia de recuperación espontanea de la memoria, indicando que la administración de ASO *c-fos* a las 12 horas del entrenamiento produce un déficit duradero sobre la memoria.

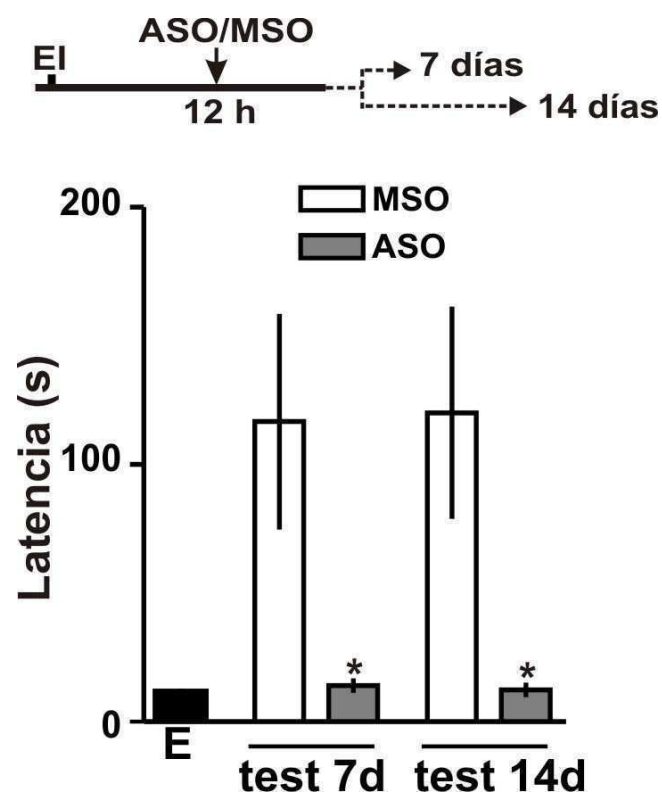


Figura 11. La infusión de ASO *c-fos* en el hipocampo perjudica la persistencia de la memoria de manera permanente. Los datos están expresados como media ± SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E) o la sesión de test, * $p < 0.05$, ASO vs MSO a los 7 días y 14 días después del entrenamiento; test de *Student*, $n = 10-12$ por grupo.

Dado que la expresión de Zif268 podría verse reducida por el ASO *c-fos* (Dragunow y col. 1994), decidimos evaluar si el efecto de la infusión bilateral de ASO *c-fos* 12 horas luego del entrenamiento sobre la persistencia de la memoria de EI era debido a una reducción de los niveles proteicos de Zif268. La infusión del ASO *c-fos* no produjo cambios en el incremento de los niveles proteicos de Zif268 inducido por aprendizaje en el hipocampo a las 24 horas del entrenamiento (**Figura 12**).

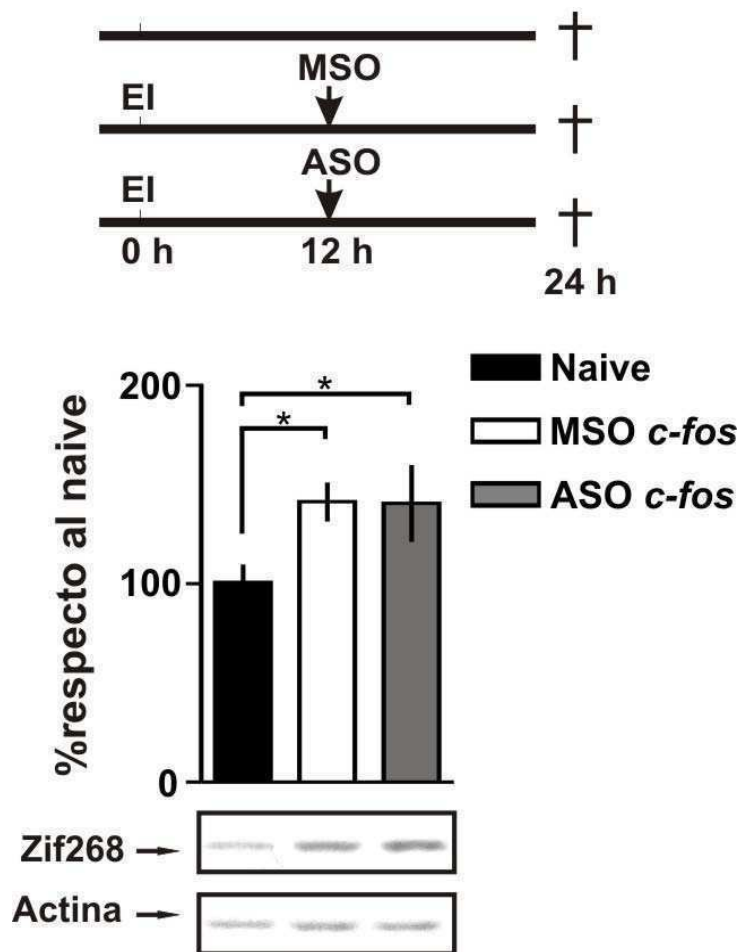


Figura 12. La infusión de ASO *c-fos* en la región CA1 del hipocampo dorsal 12 horas post-entrenamiento no produce cambios sobre el aumento de Zif268 inducido por el aprendizaje. Los animales fueron infundidos en el hipocampo dorsal con MSO *c-fos* (barras blancas) o ASO *c-fos* (barras grises) 12 horas después del entrenamiento. A las 24 horas del entrenamiento, se disecó el hipocampo dorsal para ser utilizado en ensayos de Western blot, realizado con anticuerpo específicos contra Zif268 y Actina (blots representativos, abajo). Las barras muestran el porcentaje de los niveles

normalizados respecto de los animales naïves. *, $p < 0.05$ en el test *Newman-Keuls* después de ANOVA, $n = 6$.

Además, a diferencia de la infusión de ASO *c-fos*, la infusión de ASO *zif268* 12 horas post-entrenamiento no induce ninguna alteración en la expresión de la memoria de EI a los 7 días de entrenamiento (**Figura 13**). Estos resultados indican que la inhibición de la expresión de *Zif268* alrededor de las 18-24 horas luego del entrenamiento no interfiere con el almacenamiento persistente de la información.

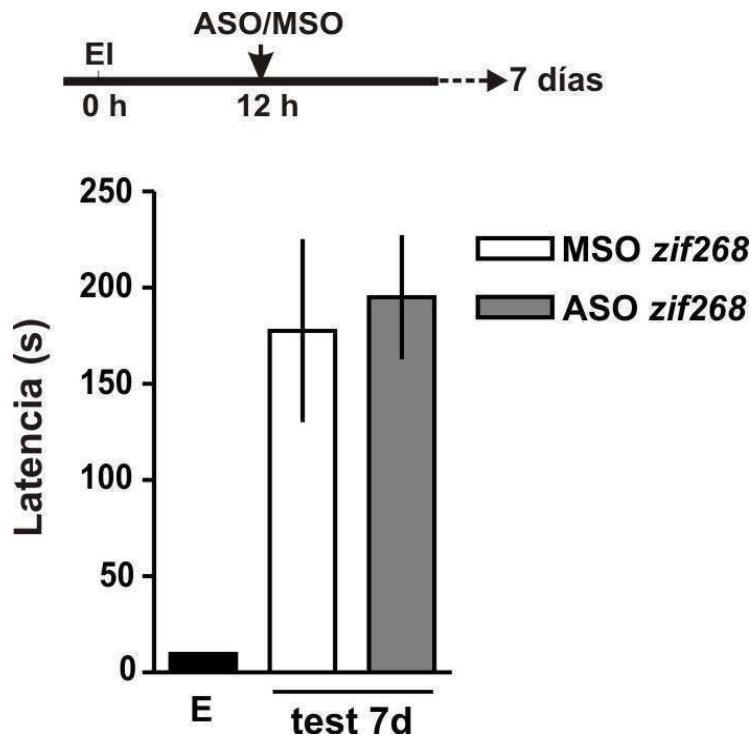


Figura 13. La infusión de ASO *zif268* en la región CA1 del hipocampo dorsal 12 horas post-entrenamiento no tiene efectos sobre la persistencia de la memoria de EI. Los datos están expresados como media \pm SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E) o la sesión de test, $p > 0.05$, ASO vs MSO 7 días después del entrenamiento; test de *Student*, $n = 10-12$ por grupo.

Las sesiones de testeo de EI pueden sufrir modificaciones causadas por factores como la actividad locomotora basal y el estado de ansiedad, las cuales podrían ser potencialmente afectadas por ASO *c-fos*. Para excluir estos posibles efectos evaluamos el comportamiento de animales infundidos con ASO *c-fos* a 12 horas luego del entrenamiento, en un campo abierto y en un laberinto elevado en forma de cruz.

La infusión de ASO *c-fos* dentro de la región CA1 del hipocampo dorsal 12 horas luego del entrenamiento no afectó el estado de ansiedad de los animales ni la actividad exploratoria en un nuevo ambiente, como tampoco alteró la actividad locomotora basal, a los 7 días. (**Figura 14**). Estos resultados sugieren fuertemente que el déficit de memoria observado es causado directamente por la inhibición de la expresión de c-Fos requerida para la persistencia de la traza de memoria. Además, no parecería que las bajas latencias obtenidas 7 días luego del entrenamiento fueran causadas por modificaciones en la *performance* comportamental, ya que la administración de ASO *c-fos* a diferentes tiempos alrededor del período crítico no produjo ningún déficit en la retención de la memoria de 7 días (**Figura 10**).

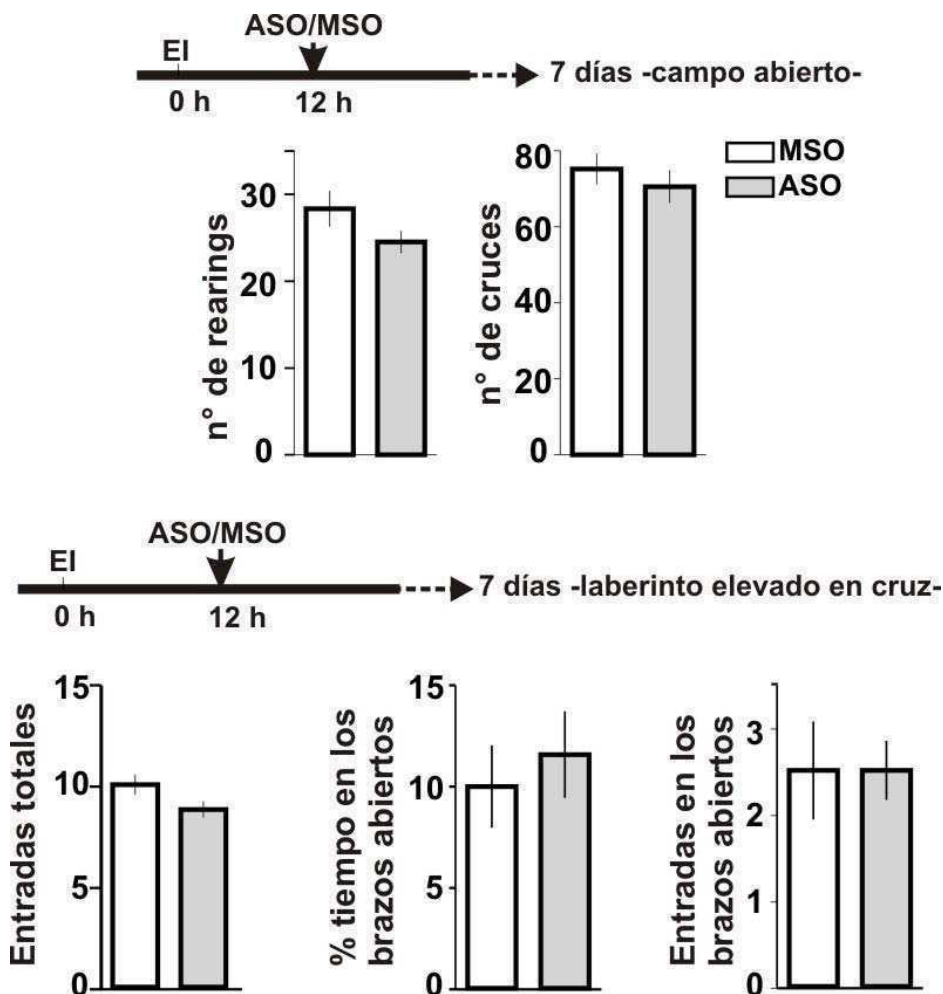


Figura 14. La infusión de ASO *c-fos* 12 horas luego del entrenamiento no afecta la conducta exploratoria, la actividad locomotora basal o los niveles de ansiedad. Los paneles de arriba muestran el número de *rearings* (izquierda) y cruces (derecha) durante una sesión de campo abierto de 5 minutos de animales que recibieron MSO (barras blancas) o ASO (barras grises) 12 horas luego del entrenamiento, 7 días antes de la realización del test. Los datos están expresados como la media \pm SEM del número de *rearings* o cruces, $p > 0.1$, test de *Student*, $n = 8$ por grupo. Los paneles de abajo muestran el número total de entradas (izquierda), el tiempo que pasó el animal en las ramas abiertas (medio) y el número de entradas en los brazos abiertos (derecha), durante una sesión de 5 minutos en el laberinto elevado en cruz de ratas que habían recibido una infusión bilateral de MSO (barras blancas) o ASO (barras grises) en la región CA1 del hipocampo 7 días antes del test; $p > 0.1$, test de *Student*, $n = 8$ por grupo. La parte superior de cada panel muestra el esquema del procedimiento utilizado en cada experimento.

I. 4. La promoción de una memoria persistente depende de NE y requiere de c-Fos en el hipocampo.

Una vez establecido el requerimiento específico de una onda tardía de expresión de c-Fos para la persistencia del almacenamiento de la MLT de EI, nos preguntamos si la inducción de esta segunda onda de expresión de c-Fos en la región CA1 del hipocampo dorsal podría promover de alguna manera la persistencia de una memoria. Trabajos previos han demostrado que la estimulación de los receptores β -adrenérgicos incrementan los niveles de c-Fos en el hipocampo (Bing y col. 1992).

De esta manera, para analizar el rol de c-Fos en la promoción de la persistencia de la MLT, utilizamos un protocolo de entrenamiento suave que genera una MLT que decae más allá de los 3 días (ver **Figura 4**). En animales entrenados bajo este protocolo la infusión de norepinefrina (NE 0,3 μ g/lado) en la región CA1 del hipocampo dorsal 12 horas luego del entrenamiento induce un incremento en la expresión de c-Fos a las 24 horas post-entrenamiento (**Figura 15**). Además, se puede observar que la infusión de ASO *c-fos* en la región CA1 del hipocampo dorsal, pero no la infusión de MSO, 1 hora antes de la infusión de NE, impide el incremento en la expresión de c-Fos observado a las 24 horas.

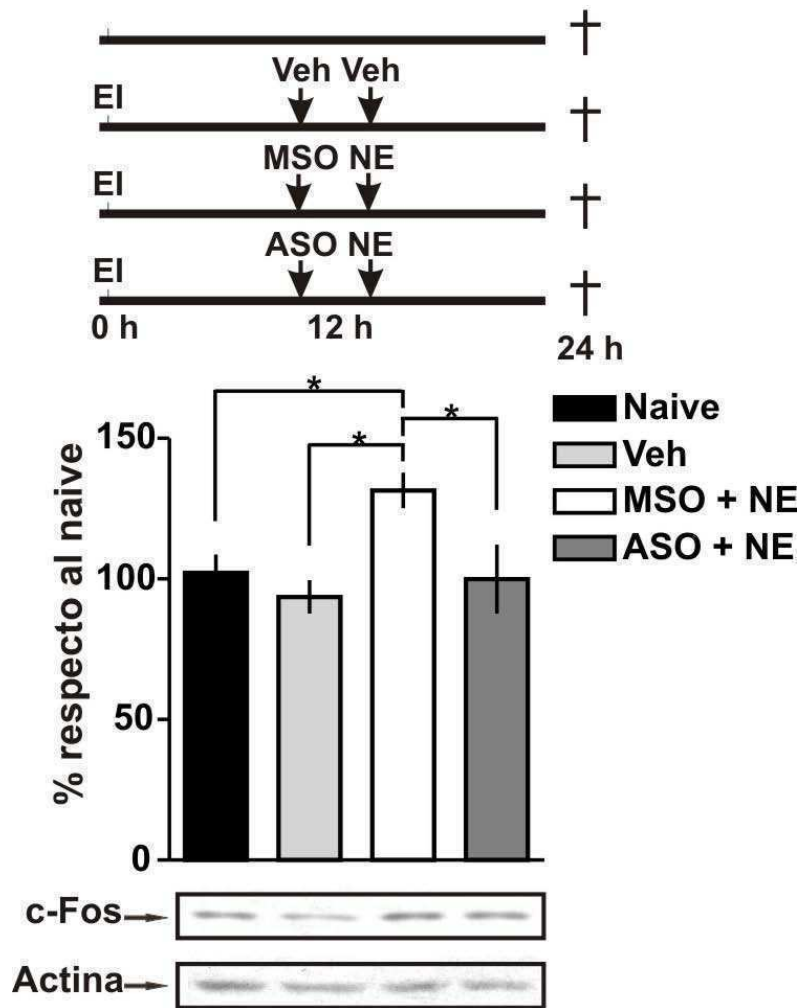


Figura 15. La infusión de ASO *c-fos* dentro de la región CA1 del hipocampo dorsal bloquea el incremento en la expresión de c-Fos 24 horas post-entrenamiento inducida por la administración de NE a las 12 horas. Los animales fueron infundidos en el hipocampo dorsal con vehículo (Veh, barra gris clara), MSO (barra blanca) o ASO (barra gris oscura) (2 nmol/ μ l; 1 μ l/lado) 11 horas después del entrenamiento. Una hora más tarde, fueron infundidos además con Veh (barra gris clara) o NE (barra blanca y gris oscura; 0.6 μ g/ μ l; 0.5 μ l/side). 24 horas después del entrenamiento, se disecó el hipocampo dorsal para análisis de Western blot sobre el contenido de c-Fos y Actina (blots representativos, abajo). Las barras muestran el porcentaje normalizado de los niveles de respecto de los animales naïve (barra negra). *, $p < 0.05$ en *Newman-Keuls* test después de ANOVA, $n=6$.

Luego del análisis bioquímico del efecto de la NE sobre la expresión de c-Fos en el hipocampo, utilizando el protocolo de entrenamiento suave, estudiamos el efecto de dicha droga sobre el comportamiento. Encontramos que la infusión de NE en la región CA1 del hipocampo dorsal promueve la persistencia de la memoria de EI a los 7 días del entrenamiento (**Figura 16**, panel derecho). Además, se puede observar que la promoción de la persistencia de la memoria inducida por NE, se bloquea mediante la administración del ASO *c-fos* 1 hora antes de la infusión de la droga promotora. Los efectos observados a 7 días no fueron encontrados cuando los animales fueron testeados 2 días luego del entrenamiento (**Figura 16**, panel izquierdo).

Estos hallazgos indican que la persistencia en el almacenamiento de la memoria inducida por NE a las 12 horas en la región CA1 del hipocampo dorsal, es mediada por la expresión *de novo* de c-Fos durante una ventana temporal tardía luego del entrenamiento. Es importante resaltar que estos resultados indican que el incremento tardío en la expresión de c-Fos en el hipocampo dorsal promueve la persistencia de la memoria, transformando una MLT no duradera en una persistente.

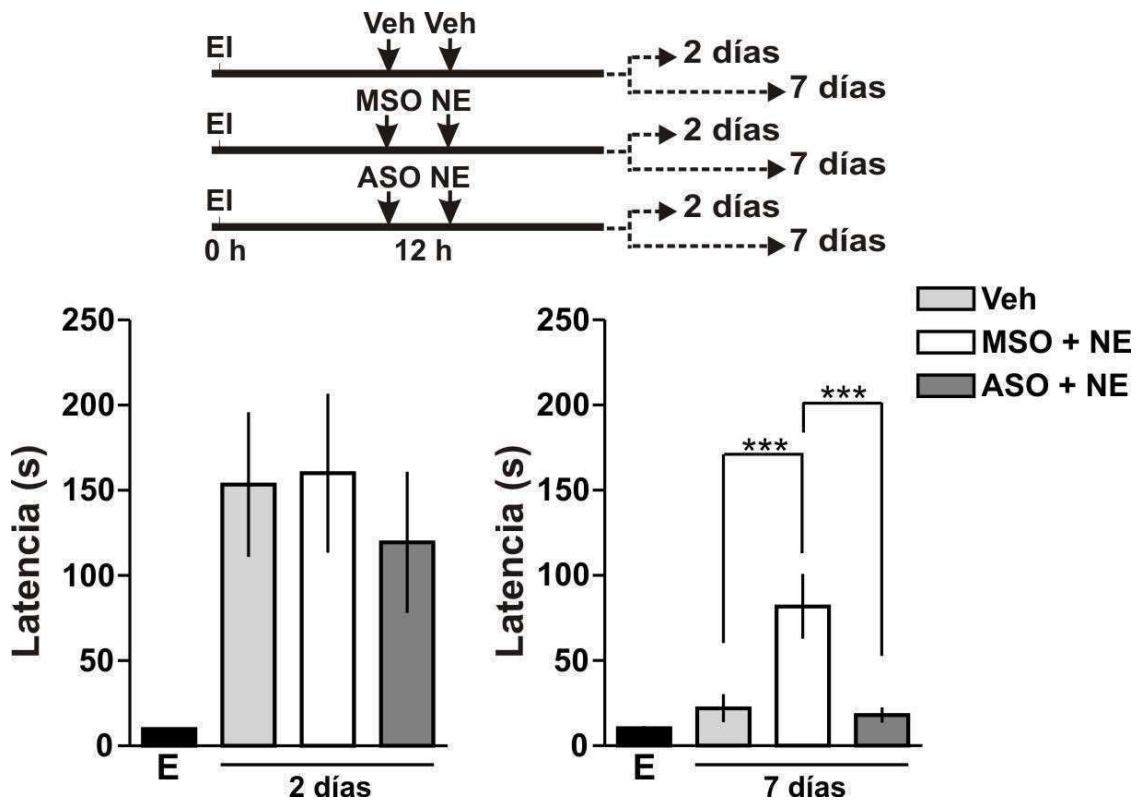


Figura 16. La infusión de ASO *c-fos* previene la promoción de la persistencia de la memoria dependiente de NE. Los animales fueron infundidos en el hipocampo dorsal con vehículo (Veh; barra gris clara), MSO (barra blanca) o ASO (barra gris oscura) 11 horas después del entrenamiento. Una hora más tarde, fueron infundidos también con Veh (barra gris clara) o NE (barra blanca y gris oscura). Los datos están expresados como media \pm SEM de la latencia a descender en el entrenamiento (E, barra negra) o en el testeo de 2 días (panel izquierdo) o 7 días (panel derecho) después del entrenamiento. ***, $p < 0.001$ en el test *Newman-Keuls* después de ANOVA, $n = 8-10$.

Capítulo II.

Rol de la corteza retrosplenial en la formación y persistencia de una memoria

II. 1. Cambios en la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial inducidos por aprendizaje.

A partir de los resultados obtenidos en el hipocampo y su rol en la persistencia de la memoria, nos preguntamos si dicha estructura estaría actuando en conjunto con otras estructuras en el cerebro. A pesar de que la plasticidad cortical parece ser esencial para el establecimiento permanente de las trazas de memoria, poco se sabe acerca de los eventos moleculares y celulares que soportan la consolidación de la memoria en las cortezas.

Con el objetivo de identificar qué estructuras corticales podrían estar asociadas al hipocampo para el establecimiento de una nueva traza de memoria, realizamos un mapeo de actividad neuronal mediante ensayos de inmunohistoquímica a distintos tiempos luego de un entrenamiento de EI. Encontramos un llamativo aumento en la inmunoreactividad de c-Fos 1, 12 y 24 horas luego del entrenamiento fuerte de EI en la corteza retrosplenial (**Figura 17**). Dicho aumento se observa únicamente en animales sometidos a un entrenamiento EI que deja una memoria duradera (ver **Figura 4**, capítulo I).

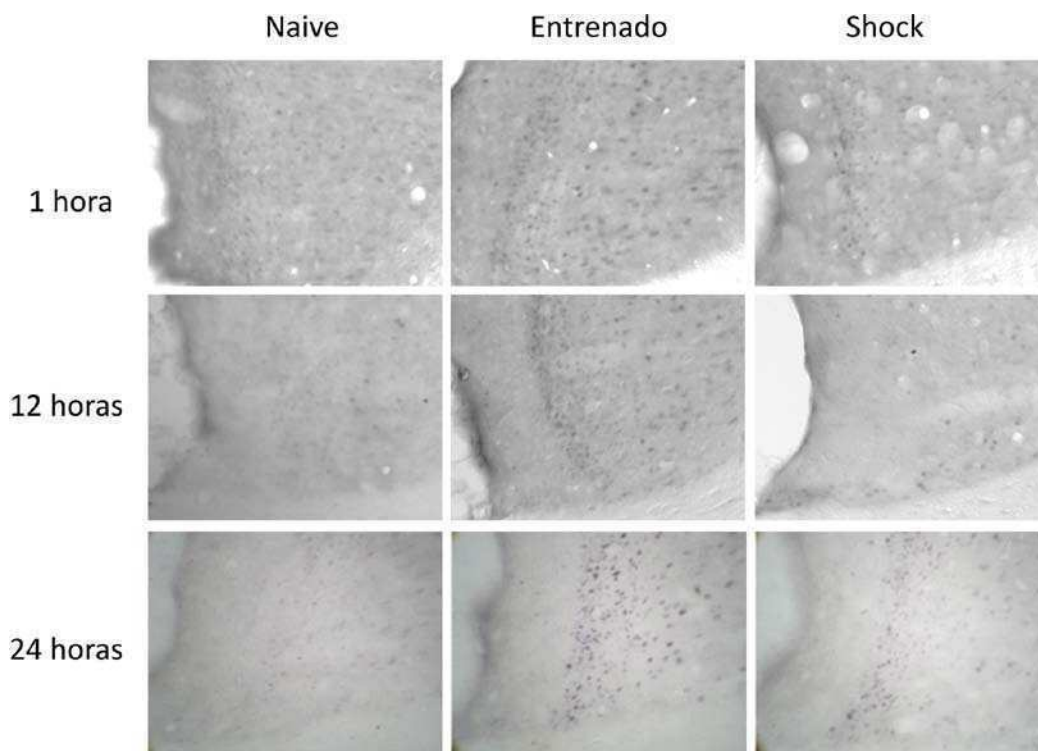


Figura 17. Aumento en la inmunoreactividad de c-Fos en la corteza retrosplenial luego de un entrenamiento fuerte de EI. Los animales fueron entrenados según el protocolo fuerte de EI o sólo sometidos a shock y sacrificados luego de 24 horas para la realización de ensayos de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra la proteína c-Fos.

A partir de estos hallazgos, decidimos estudiar los cambios de expresión de c-Fos asociados a la tarea de EI visualizados por inmunohistoquímica en la corteza retrosplenial, midiendo los niveles de la proteína c-Fos a diferentes tiempos luego del entrenamiento. A través de la técnica de Western blot pudimos confirmar los aumentos hallados por inmunohistoquímica 1, 12 y 24 horas luego del entrenamiento (**Figura 18**). Al igual que en hipocampo parecería haber más de una onda de expresión de c-Fos asociada a la formación de una MLT, lo cual se deduce por el decaimiento a los valores basales de expresión de c-Fos a las 6 y 30 horas luego del entrenamiento de EI. No se

observaron diferencias entre el grupo naïve y el grupo no entrenado que sólo recibió shock (datos no mostrados).

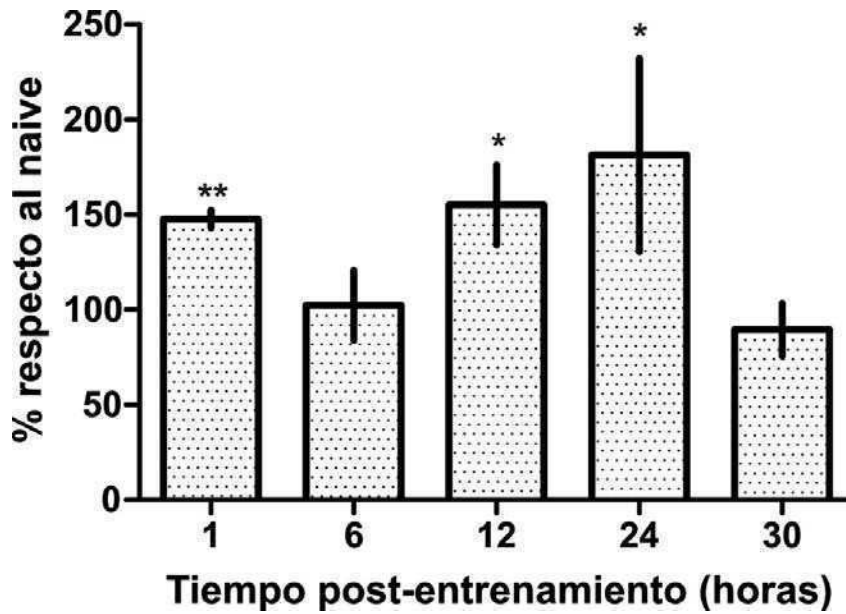


Figura 18. Curso temporal de los cambios en los niveles de c-Fos en la corteza retrosplenial de ratas entrenadas en la tarea de EI. Ratas entrenadas fueron sacrificadas 1, 6, 12, 24 y 30 horas luego del procedimiento conductual, la corteza retrosplenial fue disecada y homogeneizada para realizar ensayos de Western blot con anticuerpos específicos contra la proteína c-Fos. Las barras indican el porcentaje de cambio en el grupo E respecto del grupo naïve para cada punto en el tiempo. Los datos están expresados como medias \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, test de *Student*, $n = 5-6$ por grupo.

II. 2. La síntesis de mensajeros en la corteza retrosplenial es necesaria para la formación de la MLT.

Es de amplio conocimiento que la transcripción se requiere tempranamente para la formación de la MLT en el hipocampo (Duvarci y col. 2008; Igaz y col. 2002, Mizuno 2005). Asimismo, hemos demostrado en el capítulo anterior, el requerimiento de una fase tardía dependiente de transcripción para que una memoria persista en el hipocampo. El aumento en los niveles de expresión de c-Fos, con su conocido rol como factor de transcripción, nos lleva a estudiar el requerimiento transcripcional en la corteza retrosplenial para la formación de la MLT.

A diferencia de lo que ocurre en el hipocampo, el inhibidor de la transcripción, α -amanitina, infundida 15 minutos antes o 12 o 24 horas luego de un entrenamiento de EI en corteza retrosplenial afecta la retención de la memoria 2 días después del entrenamiento (**Figura 19**). Además, este efecto amnésico sería permanente, ya que animales que recibieron la infusión del inhibidor de la transcripción en los horarios mencionados, también resultan amnésicos al ser testeados 7 días luego del entrenamiento de EI. Estos resultados indican que la síntesis de mensajeros en la corteza retrosplenial es necesaria temprana y tardíamente para la formación de una memoria de EI.

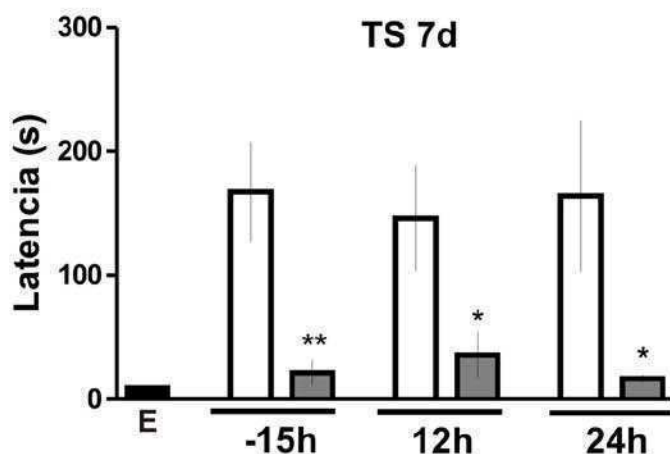
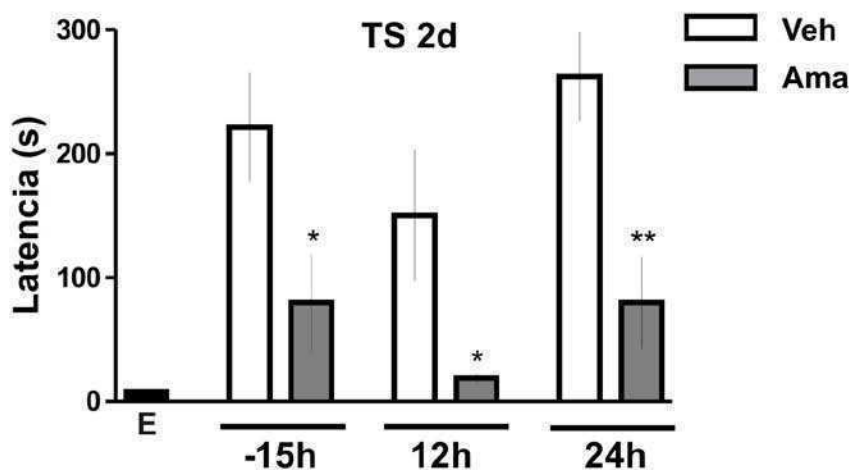
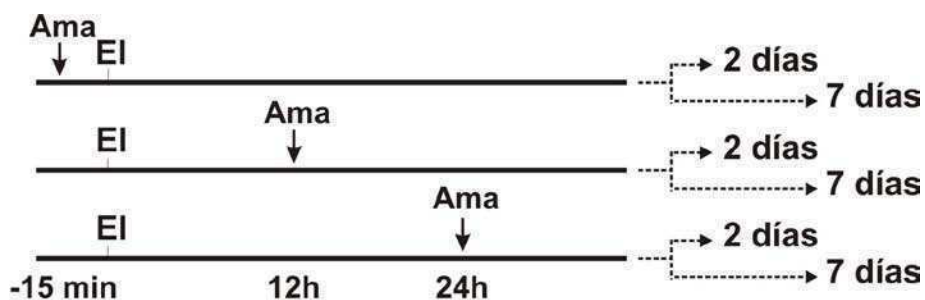


Figura 19. La inhibición de la transcripción en la corteza retrosplenial afecta la formación y persistencia de la memoria alrededor del entrenamiento y a tiempos tardíos. La infusión de α -amanitina (barra gris) -inhibidor de la transcripción- en la corteza retrosplenial 15 minutos, 12 o 24 horas luego del entrenamiento produce amnesia en un test realizado a los 2 y 7 días. Los datos están expresados como media \pm SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E, barra negra) o la sesión de test. (**) $p < 0.01$; (*) $p < 0.05$ respecto al grupo Vehículo (Veh, barra blanca); test de *Student*, $n = 5-6$ por grupo.

II. 3. La formación de la memoria requiere de síntesis proteica temprana y la persistencia requiere de síntesis proteica tardía en la corteza retrosplenial.

Existen numerosos trabajos que evidencian la necesidad de síntesis de nuevas proteínas en el hipocampo, alrededor del momento del entrenamiento y algunas horas más tarde, para que una memoria se consolide (Agranoff 1965; Barondes 1970; Davis y col. 1984; Izquierdo y col. 1998; McGaugh 2000, Igaz y col. 2002). A su vez, nuestro laboratorio demostró la existencia de una ventana temporal tardía de persistencia de la memoria dependiente de síntesis proteica (Bekinschtein y col. 2007).

En el caso de la corteza retrosplenial, inhibiendo la traducción mediante el uso de anisomicina o emetina, dos inhibidores de la síntesis proteica con mecanismos disimiles, encontramos que los requerimientos son similares a los descritos previamente para hipocampo. Al ser administradas 15 minutos antes del entrenamiento de EI, ambas drogas resultaron amnésicas cuando los animales fueron testeados a los 2 días (**Figura 20**). Sin embargo, no se observaron efectos sobre la retención de la memoria a los 2 días cuando se infundieron a 12 o 24 horas luego del entrenamiento (**Figura 20**). Estos inhibidores de la traducción sólo tuvieron efecto sobre la persistencia de la memoria, al ser infundidos 12 horas luego del entrenamiento. Por otro lado, la administración de dichos inhibidores de la traducción 24 horas luego del entrenamiento, no tuvo efectos sobre la memoria testeada a 2 o 7 días.

A partir de estos resultados podemos concluir que la síntesis de proteínas en la corteza retrosplenial sería necesaria para la formación de la memoria alrededor del momento del entrenamiento y tardíamente para la persistencia de la memoria, tal como ocurre en el hipocampo.

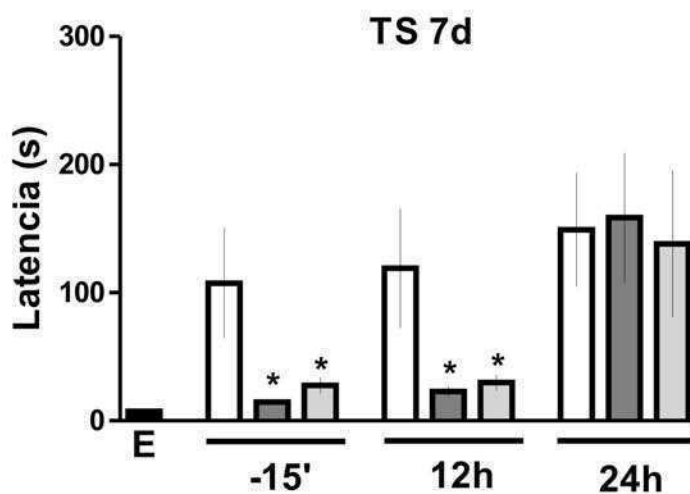
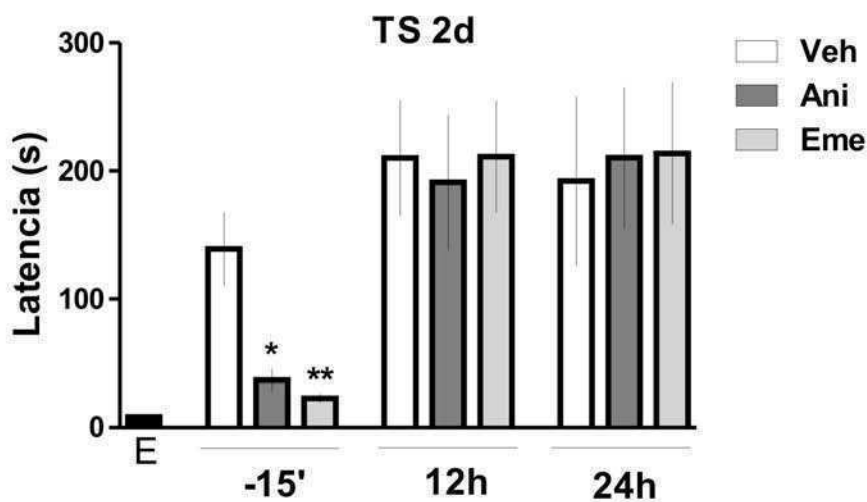
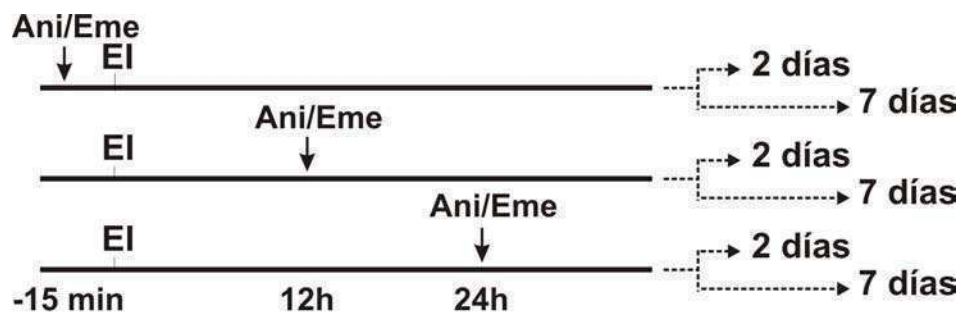


Figura 20. La inhibición de la traducción en la corteza retrosplenial afecta la formación de la memoria al momento del entrenamiento y la persistencia, a tiempos tardíos. La infusión de inhibidores de síntesis proteica – anisomicina o emetina– 15 minutos antes del entrenamiento de EI tienen efecto amnésico cuando la memoria es testeada a 2 y a 7 días. Sin embargo, cuando los inhibidores son administrados 12 horas luego del entrenamiento no tienen efecto en la memoria testeada a los 2 días, pero sí sobre la persistencia. Los datos están expresados como media \pm

SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E, barra negra) o la sesión de test, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$, Grupo Ani (barra gris oscura) o Eme (barra gris clara) vs grupo vehículo (Veh, barra blanca) a los 2 y 7 días; test de *Student*, $n = 8-10$ por grupo.

II. 4. El rol de la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial.

Para estudiar el rol de la corteza retrosplenial respecto del hipocampo en cuanto a la formación y persistencia de la memoria, decidimos continuar evaluando el papel de c-Fos en dicha corteza. Trabajos previos han mostrado aumentos de c-Fos en la corteza retrosplenial, algunos de los cuales hacen referencia a la expresión de dicha proteína como marcador de memorias remotas (Frankland y col. 2001; Frankland y col. 2004; Maviel y col. 2004) y otros referidos a memorias asociadas a miedo (Radwanska y col. 2010). Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha dilucidado si c-Fos cumple un rol en el guardado o mantenimiento de la memoria en dicha estructura.

Para evaluar el rol de c-Fos en la corteza retrosplenial, realizamos experimentos que involucran el uso del oligonucleótido anti-sentido para el mensajero de *c-fos* (ASO *c-fos*). En la **figura 21** podemos observar que la infusión del Aso *c-fos* en la corteza retrosplenial a distintos tiempos no produce efectos sobre la expresión de la memoria a los 2 días del entrenamiento de EI, con excepción de un efecto parcial de la infusión inmediatamente post-entrenamiento. Por el contrario, las infusiones realizadas en la corteza retrosplenial 4 horas antes, 8 y 12 horas luego del entrenamiento tuvieron un efecto amnésico en la persistencia de la memoria (**Figura 21**). Sin embargo, la infusión de este oligonucleótido inmediatamente o 24 horas luego del entrenamiento no afecta la retención de la memoria a 7 días.

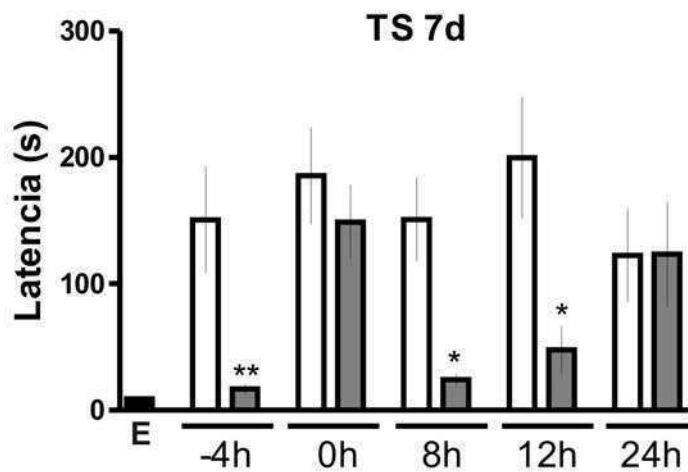
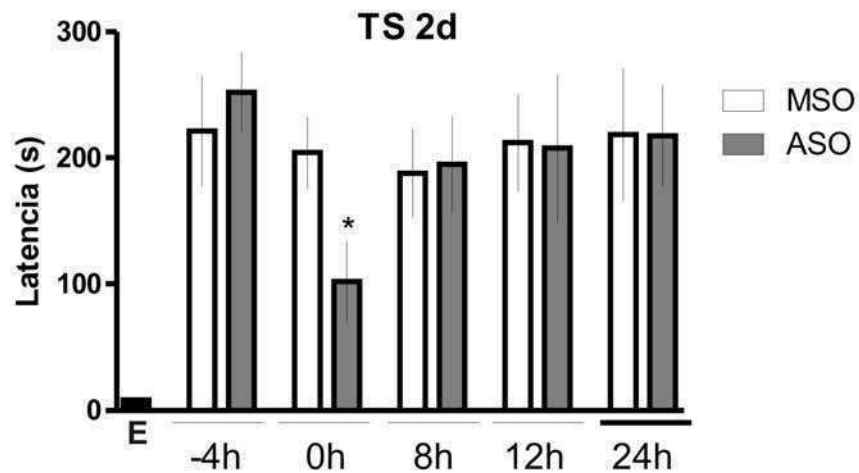
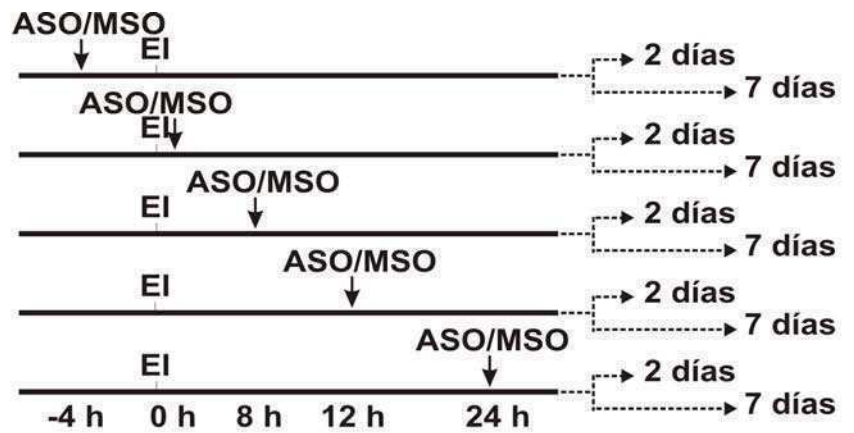


Figura 21. La expresión tardía de c-Fos en la corteza retrosplenial es necesaria para la persistencia de la memoria, pero no para su formación. Las infusiones de oligonucleótidos antisentido de *c-fos* (ASO, barra gris), pero no de sinsentido (MSO, barra blanca), 4 horas antes, así como 8 y 12 horas luego del entrenamiento de EI, produce amnesia a los 7 días, pero no a los 2. La infusión realizada inmediatamente

luego del entrenamiento no tuvo efecto sobre la retención a los 7 días, pero sí afectó parcialmente la expresión de la memoria a 2 días. Los datos están expresados como media \pm SEM de las latencias a descender de la plataforma en la sesión de entrenamiento (E, barra negra) o la sesión de test, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ ASO vs MSO a los 2 y 7 días; test de *Student*, $n = 8-10$ por grupo.

Cabe resaltar, que se trataría de dos ventanas temporales dependientes de expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial para que una memoria persista, ya que cuando se infunde el ASO inmediatamente post-entrenamiento, el bloqueo de la síntesis de c-Fos no tiene efectos sobre la persistencia de la memoria cuando se la evalúa a 7 días. De esta manera podemos concluir que la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial sería necesaria para que una memoria persista, pero no para su formación, en al menos dos ventanas de tiempo.

Discusión

Conclusiones generales

Los principales hallazgos de este trabajo son: 1) la síntesis de novo de ARNm involucra una onda tardía de expresión de c-Fos en el hipocampo de la rata, requerida durante una ventana temporal restringida alrededor de las 24 horas luego del entrenamiento para la persistencia de la memoria, pero no para su formación. Estos resultados demuestran que el hipocampo todavía está comprometido en el procesamiento de la memoria luego que la MLT ya está formada, 2) además describimos una fase de expresión de c-Fos hasta ahora desconocida, la cual juega un papel importante en el mantenimiento de la traza de memoria en el tiempo. Junto con reportes recientes que muestran que una fase tardía de estabilización dependiente de síntesis proteica y BDNF es crucial para la persistencia de la MLT en ratas (Bekinschtein y col. 2007; Bekinschtein y col. 2008; Ou y col. 2010) y para la facilitación de largo término en *aplysia* (Miniaci y col. 2008), nuestros hallazgos apoyan la hipótesis que el almacenamiento de MLT duraderas se consigue con rondas recurrentes de procesos dependientes de síntesis de ARNm y proteínas parecidos a los que ocurren durante la formación de la memoria (Dudai y Eisenberg 2004; Abraham y Robins 2005; Bekinstein y col. 2007; Miyashita y col. 2008).

Luego de haber entrenado a las ratas en una tarea de aprendizaje aversivo, hemos encontrado que existen dos ondas de expresión de c-Fos en el hipocampo: la esperada onda temprana alrededor de una hora luego del entrenamiento (Guzowski y McGaugh 1997, Gusowski y col. 2001; Izquierdo y Medina 1997; Huff y col. 2006; Countryman y col. 2005), tanto en un entrenamiento con protocolo suave como fuerte, la cual está involucrada en la formación de la MLT de EI, y una onda tardía de larga duración, cuyo pico se observa a las 24 horas del entrenamiento de las ratas con un protocolo fuerte, el cual está específicamente involucrado en la persistencia de la memoria. Además,

mostramos que la infusión de NE a las 12 horas en el hipocampo luego de un entrenamiento suave, induce la onda tardía de expresión de c-Fos y a su vez, promueve un aumento en la perdurabilidad de la memoria.

En la segunda parte de este trabajo, mostramos que además del hipocampo y al parecer en paralelo con el mismo, la corteza retrosplenial estaría participando en el procesamiento de la MLT. Hemos encontrado que dicha corteza participa desde el comienzo en la formación de la memoria mediante mecanismos que involucran la síntesis *de novo* de mensajeros y proteínas. Asimismo, la síntesis de mensajeros a tiempos tardíos luego del aprendizaje, 12 y 24 horas, continuaría siendo necesaria para la consolidación de la memoria, mientras que la síntesis de proteínas tardía pasaría a ser necesaria para la persistencia de la memoria en una ventana temporal restringida.

Conjuntamente, mostramos la existencia de dos ondas de expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial, inducidas por aprendizaje, cuyo rol estaría exclusivamente asociado con el almacenamiento de una memoria duradera, sin intervenir en la formación de la misma. Nuevamente, estos resultados dan cuenta de la existencia de ondas recurrentes de síntesis de mensajeros y proteínas, necesarias para que una memoria persista.

c-Fos al comienzo en el hipocampo

La onda temprana de expresión de c-Fos observada en este trabajo es, de hecho, parte de un pulso rápido de aumento de transcripción de genes que ocurre dentro de 1-2 horas luego de la estimulación o actividad neuronal (Lanahan y Worley 1998). Esta activación genómica rápida se denomina respuesta IEG, la cual involucra un amplio repertorio funcional de moléculas, incluyendo factores de transcripción, factores de

crecimiento, proteínas involucradas en transducción de señales y componentes del citoesqueleto (Lanahan y Worley 1998; Guzowski 2002), y representa una unión entre activación neuronal y procesamiento de MLT. Se ha estimado que la respuesta total de IEGs es de alrededor de 30-40 genes, siendo un tercio de los mismos ITFs y el resto codifica para genes efectores (Lanahan y Worley 1998).

La inducción de IEG ha sido atribuida a la experiencia novedosa o a la “saliencia del contexto” en varios estudios comportamentales diferentes (Guzowski 2002; Clayton 2000). Claramente, la suposición explícita de esta hipótesis es que el papel funcional de un determinado IEG es la participación en la formación de la memoria de la experiencia que indujo su expresión. Sin embargo, hay interpretaciones alternativas. Una explicación que atrajo mucha atención es el posible papel de los IEGs como detectores de coincidencia y/o señales de metaplasticidad (Clayton 2000; Guzowski 2002).

En este marco, la expresión de un determinado IEG, por ejemplo c-Fos, se vuelve importante para los circuitos neuronales sólo cuando su inducción está asociada a *inputs* adicionales posteriores. En otras palabras, el incremento en la expresión de c-Fos podría permitir un estado metaplástico que aumenta el almacenamiento de la memoria para acontecimientos posteriores (Clayton 2000).

Aumento tardío de un gen temprano en el hipocampo

La segunda y tardía onda de expresión de c-Fos observada luego de un protocolo de entrenamiento fuerte de EI, el cual deja una MLT persistente es, en parte, inesperada. Este aumento en los niveles de c-Fos parece ser transitorio y de mayor duración que el primero, ya que hay un aumento lento entre las 18-24 horas que cae a los niveles del control hacia las 30 horas. Aunque hay reportes esporádicos alegando que ITFs como c-

Fos pueden fluctuar sobre los valores control las primeras 6 horas luego de una estimulación periférica nociva (Redburn y Leah 1997), o que una expresión tardía y prolongada de c-Fos ocurre durante un año luego de una única convulsión (Bing y col. 1997), o que una segunda onda de expresión de c-Fos aparece a los 4-7 días en el hipocampo en estrecha asociación con muerte celular excitotóxica (Smeyne y col. 1993), los presentes hallazgos representan la primera evidencia de una onda de expresión tardía y transitoria de c-Fos asociada a un suceso neurobiológico relevante como el procesamiento natural de la memoria. De hecho, nuestros datos sugieren fuertemente que esta onda es un evento central para los mecanismos moleculares que subyacen a la persistencia del almacenamiento de la memoria.

En este trabajo, mostramos que el uso de ASO *c-fos* produce un déficit en la persistencia de la memoria evaluada a los 7 días, sin afectar su formación, dado que su expresión a los 2 días no se diferencia de la expresada por los animales control, infundidos con el MSO *c-fos*.

Estos resultados indican que la onda tardía de expresión de c-Fos no estaría involucrada con los mecanismos de formación de la memoria, pero que sería crítica para la persistencia del almacenamiento de la MLT en el hipocampo. Esta afirmación, se ve reforzada por el hecho de que al contrario de lo que ocurre con los animales que generan una MLT persistente, un entrenamiento suave que produce una memoria visible a los 2 días, pero no a los 7 días, no induce el aumento tardío en los niveles de c-Fos.

El requerimiento de síntesis de mensajeros y de c-Fos para la persistencia de la MLT luego de varias horas de la fase dependiente de síntesis de proteínas, indican que existe una regulación dinámica compleja de los procesos de transcripción y traducción involucrados en el almacenamiento de la memoria. Varios trabajos han descripto

cambios en la activación de factores de transcripción durante la consolidación de la memoria. La activación de CREB, factor de transcripción que ha sido implicado consistentemente en el procesamiento de la memoria (Silva y col. 1998) y que es considerado un marcador molecular de la misma (Viola y col. 2000), muestra un aumento prolongado luego del aprendizaje (Bernabeu y col. 1997; Guzowski y McGaugh 1997; Taubenfeld y col. 2001). Confirmando y profundizando los hallazgos previos realizados por Taubenfeld y colaboradores (2001), hemos encontrado un aumento de la fosforilación de CREB en la serina 133 a 0, 3, 6, 12 y 18-20 horas, pero no a 9 horas, luego del entrenamiento (datos no mostrados). Una segunda familia de factores de transcripción, C/EBP, también aumenta su expresión entre las 9 y las 28 horas luego del entrenamiento (Taubenfeld y col. 2001). De esta manera, sería posible que se requiera de la activación de CREB y C/EBP en algún momento ya sea para iniciar el proceso de consolidación tardía o como lectura de este proceso.

c-Fos vs. Zif268

La visión clásica de la biología moderna vincula la expresión de los IEGs a la actividad celular. En el cerebro, la expresión de los IEGs desempeña un papel importante en la regulación de la plasticidad sináptica y algunos IEGs, entre ellos c-Fos y Zif268, han sido asociados con los primeros eventos transitorios, involucrados en la formación de la memoria (Lamprecht y Dudai 1996; McGaugh 2000; Kandel 2001). Sin embargo, el rol de estos factores de transcripción en el mantenimiento de una traza de memoria persistente no ha sido estudiado.

Nuestro laboratorio ha demostrado que los aumentos tardíos de c-Fos y Zif268 inducidos por aprendizaje, son bloqueados por tratamientos que afectan la persistencia

de la memoria, como la inhibición de la síntesis proteica o de la actividad de BDNF en el hipocampo, 12 horas después del entrenamiento de EI (Bekinschtein y col. 2007). En este trabajo, mostramos que el bloqueo de la expresión de c-Fos mediante el uso de ASO, no tiene efecto sobre el aumento de Zif268 en el hipocampo inducido por entrenamiento, a pesar de los hallazgos obtenidos por Dragunow y colaboradores, que muestran que el bloqueo de la expresión de c-Fos disminuye los niveles de Zif268 en neuronas del estriado y de la neocorteza (Dragunow y col. 1994).

Por otro lado, mediante la infusión del ASO *zif268* en el hipocampo 12 horas luego del entrenamiento de EI, mostramos que el bloqueo de la expresión de dicho factor de transcripción no tiene efectos sobre la expresión de la memoria luego de 7 días del entrenamiento. Por lo tanto, podemos concluir que el aumento tardío de Zif268 inducido por el entrenamiento de EI, no estaría ligado al aumento de c-Fos, como tampoco parecería estar asociado al almacenamiento de una MLT persistente.

Iniciando la cascada persistente

Ha sido ampliamente descrito el rol de la modulación noradrenérgica en la modulación de la memoria (McGaugh 2000). Sin embargo, su rol en la persistencia del almacenamiento de la memoria no se conoció hasta este trabajo. En este trabajo, mostramos que la infusión de NE, en la región CA1 dorsal del hipocampo, 12 horas luego de un entrenamiento suave de EI, transforma una MLT que decae en un par de días en una que persiste. Encontramos que este efecto se logra a través de la inducción de la expresión de c-Fos, ya que la co-infusión del ASO *c-fos* bloquea dicho efecto promotor.

Por otro lado, la activación del receptor de dopamina D1 aumenta el BDNF en hipocampo (Rossato y col. 2009), la expresión de c-Fos (Kang y col. 2000) y controla la persistencia de la MLT (Rossato y col. 2009). Por este motivo, sugerimos que el aumento de los niveles de expresión de c-Fos 18-24 horas luego del entrenamiento es parte de una vía común, activada por catecolaminas, que regula el mantenimiento de la MLT.

De esta manera, basados en trabajos previos (Bekinschtein y col. 2007; Bekinschtein y col. 2008) y en el presente, proponemos que la inducción de la expresión de BDNF y la activación de ERK a las 12 horas del entrenamiento, son eventos cruciales para el inicio de la cascada de eventos moleculares y celulares, incluyendo la inducción de c-Fos y la fase dependiente de transcripción 24 horas luego del entrenamiento. Este paso de transcripción tardía podría dar lugar a la remodelación sináptica y al crecimiento de nuevas conexiones que se cree están involucradas en el almacenamiento persistente de MLT.

Expresión génica, plasticidad y persistencia de la memoria

Guzowski y colaboradores (Miyashita y col. 2008) han sugerido recientemente que distintas fases o etapas del aprendizaje y procesamiento de la memoria están asociados con diferentes patrones de expresión génica de una manera compleja. Encontraron que existe una red central de expresión de genes neuronales comprometida en el procesamiento de la información básica. Entre los genes comúnmente sobre-regulados se encuentran los IEGs *c-fos*, *zif268*, *arc*, *homer1a* y *jun B*. Sería necesario llevar a cabo experimentos adicionales, a tiempos más largos luego del entrenamiento, para determinar si existen varias ondas de expresión de diferentes genes con distintas

ventanas temporales que permiten la persistencia de la traza de memoria. En este contexto, la plasticidad dirigida por la expresión tardía de “genes de plasticidad” como *c-fos* sería capaz de aumentar la capacidad de procesar y almacenar información (Fusi y Abbott 2007). Notablemente, en estudios realizados mediante el uso de redes neuronales artificiales se ha visto que cambios en los pesos sinápticos dentro del conjunto neuronal dinámico son importantes para aumentar la persistencia de la traza de memoria (Abraham y Robins 2005).

En este contexto, nuestros hallazgos muestran que la transcripción y la expresión de *c-Fos* tardías luego del entrenamiento son necesarias para el mantenimiento de la traza de memoria de EI. Junto con aquellos que muestran que la transcripción y la expresión de *c-Fos* alrededor del entrenamiento son necesarias para la formación de la memoria (Igaz y col. 2002; Lamprecht y Dudai 1996; Mileusnic y col. 1996; Morrow y col. 1999; Countryman y col. 2005; Kandel 2001), se ve respaldado fuertemente el argumento de que a fin de mantener las modificaciones en los pesos sinápticos dentro de una red, la actividad ocurrida durante los eventos iniciales de codificación debe repetirse más tarde. Es importante destacar que la reactivación de los receptores NMDA en la región CA1 días después del entrenamiento es crucial para la estabilización de memoria espacial y condicionamiento de miedo al contexto (Shimizu y col. 2000; ver Day y Morris 2001). Recientemente, se ha reportado que las vías de señalización de ERK y AMPc parecen estar reactivadas repetidamente luego del entrenamiento, siendo que la integridad de la persistencia del condicionamiento de miedo depende de la integridad de las oscilaciones de ERK al menos por una semana luego del entrenamiento (Eckel-Mahan y col. 2008), sugiriendo que rondas repetidas de activación de ERK pueden contribuir a la generación de ciclos múltiples de transcripción y traducción necesarios para el mantenimiento del almacenamiento de la

MLT. Es interesante tener en cuenta que recientemente hemos encontrado que la persistencia del almacenamiento de la MLT de EI se ve selectivamente deteriorada por el bloqueo de la activación de ERK en el hipocampo dorsal 12 horas luego del entrenamiento (Bekinschtein y col. 2008).

Después de c-Fos, ¿qué sigue?

Estas repetidas ondas de reactivación de las vías de señalización y de expresión génica podrían ser las responsables de los cambios en la plasticidad sináptica necesarios para el almacenamiento de la MLT. Trabajos recientes proporcionan evidencias de que el almacenamiento de la memoria está asociado con la remodelación sináptica y el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas (Bailey y col. 2004; Lamprecht y LeDoux 2004; Barco y col. 2006). En trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos demostrado que c-Fos está sobre-regulado tardíamente luego del entrenamiento por eventos involucrados en la persistencia de la memoria dependientes de síntesis proteica y BDNF (Bekinschtein y col. 2007), así como el aumento en la densidad de espinas (Tyler y Pozzo-Miller 2001; Alonso y col. 2004). De esta manera, la transcripción tardía, dependiente de c-Fos, podría ser necesaria para la expresión de genes efectores involucrados principalmente en la remodelación sináptica asociada a la persistencia de la memoria. En este contexto, recientemente se ha publicado la ocurrencia de un aumento en el número de espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo luego de 48 horas de un condicionamiento al miedo (Restivo y col. 2009).

Estos cambios plásticos podrían ser explicados a partir de remodelaciones en la matriz extracelular. En este punto, resulta interesante mencionar a las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), las cuales conforman una gran familia de enzimas

proteolíticas de liberación, dependientes de zinc, cuyos sustratos canónicos incluyen moléculas de adhesión celular (CAMs) y proteínas de la matriz extracelular (ECMs). Las MMPs son secretadas en el cerebro por neuronas y por glía, en particular la MMP-9, en forma inactiva, transformándose a la forma proteolíticamente activa cuando se remueve el pro-péptido en respuesta a un estímulo específico (Ethell y Ethell 2007). Estudios realizados en rebanadas de cerebro y en rata, muestran una rápida activación de las MMP-9 perisináptica en la región CA1 por la inducción de LTP mediado por una estimulación tetánica de la sinapsis de la colateral de Shaffer-CA1 (Nagy y col. 2006) o por diferentes tareas de aprendizaje y memoria asociativas y no-asociativas (Nagy y col. 2007; Wright y col. 2007; Brown y col. 2008). La utilización de técnicas que producen pérdida de función, incluyendo el uso de bloqueantes farmacológicos, anticuerpos neutralizantes, o supresión génica, confirman que en ausencia de proteólisis de las MMPs, el LTP de las sinapsis del hipocampo y otras áreas corticales es transitorio (Meighan y col. 2006; Meighan y col. 2007; Nagy y col. 2006; Bozdagi y col. 2007; Okulski y col. 2007; Wang y col. 2008) y que el desempeño comportamental en diferentes tareas de aprendizaje y memoria se ve afectado (Nagy y col. 2007; Wright y col. 2007; Brown y col. 2008; Brown y col. 2009; Wiediger y Wright 2009). Otros trabajos han demostrado que la estabilidad de la expansión de las espinas que acompañan típicamente al LTP también depende de la proteólisis de la MMP-9 (Wang y col. 2008), indicando que la estabilidad funcional y estructural de la plasticidad sináptica dependen de la MMP-9.

En relación a este trabajo, la MMP-9 nos resulta de particular interés ya que su promotor se encuentra bajo la regulación de c-Fos/AP-1 (Kaczmarek y col. 2002). De esta manera, la MMP-9, junto con su inhibidor de actividad endógeno, TIMP, podrían estar regulando los cambios en la matriz extracelular que permitirían la remodelación en

las conexiones sinápticas que derivarían en cambios estructurales necesarios para el almacenamiento persistente de la memoria. Además, los niveles proteicos y la actividad proteolítica de MMP-9 aumentan en el hipocampo alrededor de las 6 horas, con un pico entre las 12 y 24 horas que decae hasta los niveles basales a las 72 horas, luego de un entrenamiento de EI, cuya memoria se ve afectada por la infusión en el hipocampo de un inhibidor específico de MMPs (Nagy y col. 2007).

Consolidación celular y de sistemas

Al plantear muchas más preguntas que respuestas, el hallazgo de una fase crítica de transcripción que involucra al menos una onda tardía de expresión de c-Fos para la persistencia del almacenamiento de la memoria, abre nuevas vías de investigación en el procesamiento de la consolidación tardía de la memoria en el hipocampo. Un punto de vista predominante en la ciencia moderna de la memoria es que hay dos tipos de consolidación de la memoria.: (1) uno rápido, llamado consolidación sináptica o celular que involucra eventos celulares y moleculares que ocurren durante y tempranamente luego del entrenamiento y subsisten por algunas horas a un par de días, (2) uno lento, consolidación de sistemas que implica la participación de algunas regiones neocorticales y su interacción con la formación hipocámpal y áreas corticales relacionadas (ver Dash y col. 2004; Wang y col. 2006). El nivel de consolidación de sistemas dura varios días, semanas a meses en la mayoría de las tareas de aprendizaje estudiados hasta el momento. La estabilización de una memoria de larga duración es alcanzada por el entramado gradual de múltiples regiones corticales que almacenan la memoria como un conjunto. En pocas palabras, la consolidación de sistemas involucra la paulatina desvinculación de estructuras tales como el hipocampo y la corteza entorrinal y un

reclutamiento progresivo de regiones neocorticales. Si la consolidación de sistemas es el principal mecanismo para el almacenamiento de MLT, un requisito obvio es que la traza de memoria debe durar suficiente tiempo en el hipocampo para permitir los pasos iniciales de consolidación de la memoria en la neocorteza. Por ello, dentro del contexto de la teoría estándar de la consolidación se desprenden preguntas importantes. La fase tardía dependiente de síntesis proteica, BDNF y transcripción que ocurre entre las 12 y 24 horas luego del entrenamiento ¿es un nexo necesario entre la consolidación celular y de sistemas? Nuevos experimentos utilizando diferentes técnicas son necesarios para abordar adecuadamente esta y otras preguntas respecto de los eventos moleculares que subyacen la persistencia de una memoria de larga duración.

Más allá del hipocampo, la corteza retrosplenial

Los cambios hallados en la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial (**Figuras 17 y 18**) podrían contribuir a responder estas preguntas. Según los resultados obtenidos en este trabajo, dicha estructura podría estar participando desde el inicio en la formación de las memorias y podría colaborar en el proceso que permitiría que las memorias se almacenen en otras estructuras corticales cuando dejan de depender del hipocampo. Es decir, podría ser como una estación de relevo colaborando en serie o paralelo, dialogando con el hipocampo mientras las memorias se almacenan definitivamente en otras estructuras corticales. Partiendo del supuesto de que el procesamiento de la memoria depende de la interacción entre el hipocampo y áreas corticales (Squire 1992; Nadel y Moscovitch 1997; Dudai 2004; Frankland y col. 2005; Morris 2006), y asumiendo que la memoria de largo término se almacena en la neocorteza, la corteza retrosplenial sería un excelente candidato, de entre las regiones

cerebrales, a formar parte de una red con el hipocampo destinada al procesamiento de la memoria.

A pesar de los numerosos trabajos que describen las conexiones entre la corteza retrosplenial y el hipocampo, varios de los cuales muestran su rol en el procesamiento de la memoria a través de lesiones (Harker y Whishaw 2004; Albasser y col. 2007; Dumont y col. 2010; Pothuizen y col. 2010), ninguno de ellos ha estudiado su rol en la persistencia de la traza mnésica en forma directa, más allá de las correlaciones de los aumentos de actividad neuronal y expresión de memorias remotas (Maviel y col. 2004; Frankland y Bontempi 2005). En definitiva, la mayoría de los trabajos publicados acerca de esta estructura son estudios realizados con lesiones permanentes, lo cual no permite obtener un panorama claro para definir un rol temporal en el procesamiento de la memoria.

Distintos roles para transcripción y traducción

Hemos encontrado que en la corteza retrosplenial existen requerimientos de síntesis de mensajeros y de proteínas para el establecimiento de nuevas memorias. Sin embargo, como mostramos previamente en relación al hipocampo, no existe una correlación directa entre la síntesis de mensajeros y la síntesis de proteínas, los cuales pueden estar desfasados. En la corteza retrosplenial, la transcripción parece ser necesaria desde el comienzo y a tiempos largos para la formación de la memoria, a diferencia del hipocampo que presenta ventanas temporales definidas de requerimiento transcripcional, una alrededor del entrenamiento y otra ventana entre 3-6 horas luego del mismo para la formación de la memoria (Igaz y col. 2002). En este trabajo también describimos un requerimiento tardío de síntesis de mensajeros en el hipocampo

necesario para que una memoria persista (ver resultados, **Figura 2**). Sin embargo, en la corteza retrosplenial, observamos que la transcripción es necesaria en todos los tiempos evaluados en este trabajo para que la memoria de EI se forme.

Por el contrario, los resultados de inhibición de la síntesis proteica en la corteza retrosplenial, muestra un requerimiento similar al observado para el hipocampo (Igaz y col. 2002, Bekinschtein y col. 2007). Se requiere de síntesis de proteínas en la corteza retrosplenial en el momento del entrenamiento para la formación de la memoria. Sin embargo, el requerimiento tardío de traducción sería necesario para la persistencia, pero no para la consolidación “temprana” de la memoria, ya que la misma se expresa normalmente a los dos días del entrenamiento. Esta similitud de resultados obtenidos en hipocampo y corteza retrosplenial se podría explicar de varias maneras. Podría ocurrir que ambas estuvieran moduladas por alguna otra estructura, o podría ser que existiera un diálogo directo entre hipocampo-corteza retrosplenial, o bien, podrían estar sucediendo ambas cosas. Sería muy interesante estudiar la existencia de este “diálogo”.

Lesiones bilaterales combinadas en corteza retrosplenial y fornix (principal salida del hipocampo) y los núcleos talámicos, producen déficit en una tarea de aprendizaje asociativo visuo espacial (Dumont y col. 2010). También se ha encontrado que la inactivación temporal de la corteza retrosplenial afecta los patrones de codificación espacial en el hipocampo, observado mediante registros celulares en animales que a su vez mostraban un déficit de aprendizaje producto de la inactivación de dicha corteza (Cooper y Mizumori 2001). Estos trabajos, muestran el fuerte vínculo entre estas dos estructuras, que llevan a preguntarnos si algunos de los efectos sobre el aprendizaje observados históricamente al intervenir en el hipocampo, no habrán sido el resultado de efectos indirectos sobre la corteza retrosplenial.

Marcadores de actividad en corteza retrosplenial... ¿Y el rol funcional?

Quienes se embarcan en la búsqueda de las regiones cerebrales que estarían involucradas en el procesamiento de la memoria han utilizado diferentes técnicas de detección de actividad neuronal para tratar de visualizar las estructuras involucradas. Algunas de las técnicas más difundidas son fMRI, consumo de (¹⁴C) 2-deoxiglucosa y expresión de genes. Entre estos últimos marcadores se encuentran los IEGs, tales como Zif268 y c-Fos. En estos trabajos, donde estudian la activación de las diferentes estructuras tanto en memorias recientes como en memorias remotas (Frankland y col. 2001; Frankland y col. 2004; Maviel y col. 2004), se observa que mientras la evocación de una memoria espacial reciente activa el hipocampo y la corteza entorrinal, la evocación de una memoria remota está asociada a la activación (relacionada con el consumo de glucosa o a la inducción de genes como c-Fos y Zif268) en zonas de la corteza prefrontal, frontal, cíngulo anterior, corteza retrosplenial y corteza temporal (Maviel y col. 2004). Resultados similares fueron obtenidos en la evocación de una memoria asociativa de miedo (Frankland y col. 2004). En particular, trabajos recientes han revelado cambios, en la corteza retrosplenial, en el consumo de glucosa y c-Fos en un condicionamiento clásico (Radwanska y col. 2010) y cambios de Zif268 y c-Fos en memoria de trabajo espacial (Pothuizen y col. 2009).

Sin embargo, esto sólo representa una correlación entre la expresión de estos marcadores moleculares y el procesamiento de la memoria. El hecho de que una zona se active durante la evocación de una memoria, no quiere decir que la traza esté almacenada en esa región, sino solamente que participa del mecanismo necesario para la evocación. En este trabajo, mostramos la existencia de dos ondas de expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial inducidas por el entrenamiento de EI *per se*.

Por otro lado, ninguno de estos trabajos muestra un rol funcional de la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial ni de esta estructura en sí en la persistencia de la MLT. Aquí, a través de la infusión localizada de ASO *c-fos*, mostramos que la expresión de esta proteína en la corteza retrosplenial es necesaria para el almacenamiento persistente de una memoria aversiva. El bloqueo de la expresión de c-Fos no afecta la formación de la memoria cuando se infunde el ASO antes del entrenamiento ni en tiempos posteriores (8 y 12 horas). Sin embargo, los mismos tiempos de infusión producen un déficit en la persistencia de la memoria, como se observa en la evaluación de desempeño en la tarea de EI realizada a los 7 días del entrenamiento. Es importante resaltar que la infusión del ASO *c-fos*, no tiene efectos sobre la estructura *per se* y su efecto es tiempo específico, ya que la infusión de este oligonucleótido inmediatamente post-entrenamiento y a 24 horas no produce efectos en la memoria a largo plazo; si bien la infusión inmediatamente post-entrenamiento, afecta parcialmente la expresión de la memoria a 2 días, posiblemente afectando de manera temporal la evocación, sin tener efectos en el almacenamiento de la MLT.

En este punto, podemos destacar un rol diferencial entre el hipocampo y la corteza retrosplenial. Según los resultados expuestos en este trabajo, a diferencia de lo observado en el hipocampo, en la corteza retrosplenial habría al menos dos ondas de expresión de c-Fos implicadas en los mecanismos de persistencia de la memoria, mientras que en el hipocampo, habíamos observado que la primera onda estaba involucrada en la formación de la MLT. Aunque esta puede resultar una diferencia aparente, ya que no podemos descartar que la primera onda de expresión de c-Fos hipocampal tenga un rol en persistencia, encubierta por los mecanismos de formación. Además, la segunda onda de expresión de c-Fos comienza más temprano en la corteza retrosplenial que en el hipocampo, dado que el aumento de expresión ya se observa a

las 12 horas. Esto nos muestra, una diferencia temporal entre ambas estructuras, y al mismo tiempo, una similitud en los mecanismos moleculares que participan en el procesamiento de la memoria.

De esta manera, en este trabajo por primera vez mostramos el rol funcional de la expresión de c-Fos en la corteza retrosplenial y la participación de esta estructura en el procesamiento de una memoria persistente. El rol de la misma parecería haber estado encubierto por la tan popular formación hipocampal. Este trabajo nos lleva a plantearnos la existencia de una interacción entre el hipocampo y la corteza retrosplenial, junto con los hallazgos Aggleton y colaboradores (2007), en el cual muestran que el apagado del hipocampo mediante el uso de diversas técnicas produce un decaimiento de la expresión en los niveles de c-Fos inducido por una serie de tareas de aprendizaje de dicha corteza (Albasser y col. 2007).

Preguntas sin responder

Como es de esperar en Ciencia cada respuesta encontrada nos lleva, inevitablemente, a realizar nuevas preguntas. El complejo estudio del cerebro, el cómo y dónde ocurren los procesos de aprendizaje y memoria, cuánto tiempo duran, si es que alguna vez dejan de sufrir modificaciones, parece no tener fin.

En este trabajo en particular, se abre camino a las cuestiones que involucran dilucidar cuáles serían los genes efectores regulados mediante la expresión de c-Fos, que permitirían los cambios plásticos en las sinapsis necesarias para que una memoria se almacene en el cerebro en forma duradera. Como mencionamos durante la discusión, el estudio de la reorganización de la matriz extracelular parecería ser un interesante camino para responder esta pregunta.

A su vez, sería muy interesante profundizar sobre la comunicación existente entre la corteza retrosplenial y el hipocampo, así como el diálogo de estas estructuras con otras áreas corticales involucradas en el procesamiento de la memoria. Asimismo, es atrayente descubrir cuáles serían los mecanismos moleculares que sostienen esta comunicación.

De esta manera, creemos que los hallazgos presentados en este trabajo, contribuyen al esclarecimiento de este tan intrigante rompecabezas del guardado de las memorias en nuestro tan complejo y fascinante cerebro, del cual aún queda mucho por conocer.

Referencias

- Abel T., Nguyen P. V., Barad M., Deuel T. A., Kandel E. R. y Bourtchouladze 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): 615-26.
- Abraham W. C. y Robins A. (2005). Memory retention—the synaptic stability versus plasticity dilemma. *Trends Neurosci* 28: 73–78.
- Agranoff B. W. (1965). Molecules and memories. *Perspect Biol Med* 9(1): 13-22.
- Ahlers S.T., Richardson R., West C. y Riccio D. C. (1989). ACTH produces long-lasting recovery following partial extinction of an active avoidance response. *Behav Neural Biol* 51(1): 102-107.
- Albasser M. M., Poirier G. L., Warburton E. C. y Aggleton J. P. (2007). Hippocampal lesions halve immediate-early gene protein counts in retrosplenial cortex: distal dysfunctions in a spatial memory system. *Eur J Neurosci*. 26(5):1254-66.
- Alberini C. M., Ghirardi M., Metz R. y Kandel E. R. (1994). C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 76(6): 1099-114.
- Alonso M., Bekinschtein P., Cammarota M., Vianna M. R., Izquierdo I. y Medina J. H. (2005). Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem* 12(5): 504-10.
- Alonso M., Medina J. H. y Pozzo-Miller L. (2004). ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 11(2): 172-8.

- Alonso M., Vianna M. R., Depino A. M., Mello e Souza T., Pereira P., Szapiro G., Viola H., Pitossi F., Izquierdo I. y Medina J. H. (2002a). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* 12(4): 551-60.
- Alonso M., Vianna M. R., Izquierdo I. y Medina J. H. (2002b). Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 22(5-6): 663-74.
- Alonso M., Viola H., Izquierdo I. y Medina J. H. (2002c). Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 77(1): 119-24.
- Amaral D. G. y Witter M. P. (1995). Capitulo 21. The rat nervous system: 443-493.
- Arthur J. S., Fong A. L., Dwyer J. M., Davare M., Reese E., Obrietan K. y Impey S. (2004). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci*. 24(18):4324-32.
- Atkins C. M., Selcher J. C., Petraitis J. J., Trzaskos J. M. y Sweatt J. D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1(7): 602-9.
- Bailey C. H., Kandel E. R. y Si K. (2004). The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron* 44; 49-57.

- Barco A., Bailey C. H. y Kandel E. R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 97(6): 1520-33.
- Barondes S. H. (1970). Cerebral protein synthesis inhibitors block long-term memory. *Int Rev Neurobiol* 12: 177-205.
- Bartsch D., Casadio A., Karl K. A., Serodio P. y Kandel E. R. (1998). CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* 95(2): 211-23.
- Bekinschtein P., Cammarota M., Igaz L. M., Bevilaqua L. R., Izquierdo I. y Medina J. H. (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53: 261–277.
- Bekinschtein P., Cammarota M., Katze C., Slipczuk L., Rossato J. I., Goldin A., Izquierdo I. y Medina J. H. (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2711–2716.
- Bernabeu R., Bevilaqua L., Ardenghi P., Bromberg E., Schmitz P., Bianchin M., Izquierdo I. y Medina J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 7041-6.
- Binder D. K. y Scharfman H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22(3): 123-31.

- Bing G., Stone E. A., Zhang Y. y Filer D. (1992) Immunohistochemical studies of noradrenergic induced expression of c-fos in the rat CNS. *Brain Res* 592:57–62.
- Bing G., Wang W., Qi Q., Feng Z., Hudson P., Jin L., Zhang W., Bing R. y Hong J. S. (1997). Long-term expression of Fos-related antigen and transient expression of delta FosB associated with seizures in the rat hippocampus and striatum. *J Neurochem* 68:272–279.
- Boccia M. M., Blake M. G., Acosta G. B. y Baratti C. M. (2005). Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice: effects of a new different learning task. *Neuroscience*. 135(1):19-29.
- Boccia M. M., Blake M. G., Baratti C.M. y McGaugh J. L. (2009). Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 91(1):93-7.
- Boccia M. M., Blake M. G., Krawczyk M. C. y Baratti C. M. (2010). Hippocampal $\alpha 7$ nicotinic receptors modulate memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Neuroscience*. 171(2):531-43.
- Bourtchouladze R., Abel T., Berman N., Gordon R., Lapidus K. y Kandel E. R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 5(4-5): 365-74.

- Bozdagi O., Nagy V., Kwei K. T. y Huntley G. W. (2007). In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J Neurophysiol.* 98(1):334-44.
- Bozon B., Kelly A., Josselyn S. A., Silva A. J., Davis S. y Laroche S. (2003). MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1432): 805-14.
- Bramham, C. R. y Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76(2): 99-125.
- Brown T. E., Forquer M. R., Harding J. W., Wright J. W. y Sorg B. A. (2008). Increase in matrix metalloproteinase-9 levels in the rat medial prefrontal cortex after cocaine reinstatement of conditioned place preference. *Synapse.* 62(12):886-9.
- Brown T. E., Wilson A. R., Cocking D. L. y Sorg B. A. (2009). Inhibition of matrix metalloproteinase activity disrupts reconsolidation but not consolidation of a fear memory. *Neurobiol Learn Mem.* 91(1):66-72.
- Brunelli M., Castellucci V. y Kandel E. R. (1976). Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science* 194(4270): 1178-81.
- Burwell R. D. y Amaral D. G. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 398(2): 179-205.
- Cammarota M., Bevilaqua L. R., Ardenghi P., Paratcha G., Levi de Stein M., Izquierdo I. y Medina J. H. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK,

CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* 76(1): 36-46.

Cermak L. S. y O'Connor M. (1983). The anterograde and retrograde retrieval ability of a patient with amnesia due to encephalitis. *Neuropsychologia* 2:213-234.

Clayton D. F. (2000). The genomic action potential. *Neurobiol Learn Mem* 74, 185-216.

Clayton N. S., Bussey, T. J. y Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nat Rev Neurosci* 4(8): 685-691.

Clayton N. S. y Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395(6699): 272-274.

Cooper B. G. y Mizumori S. J. (2001). Temporary inactivation of the retrosplenial cortex causes a transient reorganization of spatial coding in the hippocampus. *J Neurosci* 21(11):3986-4001.

Countryman R. A., Kaban N. L. y Colombo, P.J. (2005). Hippocampal c-fos is necessary for long-term memory of a socially transmitted food preference. *Neurobiol Learn Mem* 84, 175-183.

Curran T. y Morgan J. I. (1987). Memories of fos. *Bioessays*. 1987 Dec;7(6):255-8

Dash P. K., Hebert A. E. y Runyan J. D. (2004). A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Brain Res Rev.* 45(1):30-7.

- Davis H. P., Spanis C. W. y Squire L. R. (1976). Inhibition of cerebral protein synthesis: performance at different times after passive avoidance training. *Pharmacol Biochem Behav* 4(1): 13-6.
- Davis H. P. y Squire L. R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96(3): 518-59.
- Day M. y Morris R. G. (2001). Memory consolidation and NMDA receptors: discrepancy between genetic and pharmacological approaches. *Science* 293(5531): 755.
- Day J. J. y Sweatt J. D. (2010). DNA methylation and memory formation. *Nat Neurosci.* 13(11):1319-23.
- Debiec J., LeDoux J. E. y Nader K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36(3): 527-538.
- Destrade C. y Ott T. (1982). Is a retrosplenial (cingulate) pathway involved in the mediation of high frequency hippocampal rhythmical slow activity (theta)? *Brain Res.* 252(1):29-37.
- Dragunow M., Lawlor P., Chiasson B. y Robertson H. (1993) c-fos antisense generates apomorphine and amphetamine-induced rotation. *Neuroreport* 5:305–306.
- Dragunow M., Tse C., Glass M. y Lawlor P. (1994) c-fos antisense reduces expression of Krox 24 in rat caudate and neocortex. *Cell Mol Neurobiol* 14:395–405.

- Dudai Y. y Eisenberg M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44(1): 93-100.
- Dumont J. R., Petrides M. y Sziklas V. (2010). Fornix and retrosplenial contribution to a hippocampo-thalamic circuit underlying conditional learning. *Behav Brain Res.* 209(1):13-20.
- Duvarci S., Nader K. y LeDoux J. E. (2008) De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn Mem* 15: 747–755.
- Eckel-Mahan K. L., Phan T., Han S., Wang H., Chan G. C., Scheiner Z. S. y Storm D. R. (2008) Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: Implications for memory persistence. *Nat Neurosci* 11:993–994.
- Egan M. F., Kojima M., Callicott J. H., Goldberg T. E., Kolachana B. S., Bertolino A., Zaitsev E., Gold B., Goldman D., Dean M., Lu, B. y Weinberger D. R. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112(2): 257-69.
- Ethell I. M. y Ethell D. W. (2007). Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res.* 85(13):2813-23.
- Fleischmann A., Hvalby O., Jensen V., Strekalova T., Zacher C., Layer L. E., Kvello A., Reschke M., Spanagel R., Sprengel R., Wagner E. F. y Gass P. (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent

synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci* 23(27): 9116-22.

Flood J. F., Bennett E. L., Orme A. E. y Rosenzweig M. R. (1975). Effects of protein synthesis inhibition on memory for active avoidance training. *Physiol Behav* 14(2): 177-84.

Fusi S. y Abbott L. F. (2007). Limits on the memory storage capacity of bounded synapses. *Nat Neurosci* 10:485–493.

Frankland P. W. y Bontempi B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6(2): 119-30.

Frankland P. W., Bontempi B., Talton L. E., Kaczmarek L. y Silva A. J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304(5672): 881-3.

Frankland P. W., O'Brien C., Ohno M., Kirkwood A. y Silva A. J. (2001). Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* 411(6835): 309-13.

Ghirardi M., Montarolo P. G. y Kandel E. R. (1995). A novel intermediate stage in the transition between short- and long-term facilitation in the sensory to motor neuron synapse of aplysia. *Neuron* 14(2): 413-20.

Gold P. E. (2006). The many faces of amnesia. *Learn Mem* 13(5): 506-14.

- Gooney M., Shaw K., Kelly A., O'Mara S. M. y Lynch M. A. (2002). Long-term potentiation and spatial learning are associated with increased phosphorylation of TrkB and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the dentate gyrus: evidence for a role for brain-derived neurotrophic factor. *Behav Neurosci* 116(3): 455-63.
- Greenberg M. E. y Ziff E. B. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311(5985):433-8.
- Grecksch G., Ott, T. y Matthies H. (1980). The effect of intrahippocampally applied anisomycin on the retention of brightness discrimination in rats. *Behav Neural Biol* 29(3): 281-8.
- Guzowski J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12(1): 86-104.
- Guzowski J. F. y McGaugh J. L. (1997). Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2693–2698.
- Guzowski J. F., Setlow B., Wagner E. K. y 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. *J Neurosci*. Jul 15; 21(14): 5089-98.

- Hall, J., Thomas, K. L. y Everitt, B. J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3(6): 533-5.
- Hampton R. R. (2001). Rhesus monkeys know when they remember. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5359-5362.
- Hardt O., Migues P. V., Hastings M., Wong J. y Nader K. (2010). PKMzeta maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus. *Hippocampus*. 20(6):691-5.
- Harker K. T, Whishaw I. Q. (2004). Impaired place navigation in place and matching-to-place swimming pool tasks follows both retrosplenial cortex lesions and cingulum bundle lesions in rats. *Hippocampus* 14(2):224-31.
- He J., Yamada K. y Nabeshima T. (2002). A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats. *Neuropsychopharmacology* 26(2): 259-68.
- Hebb D. (1949). *The Organization of Behavior: a Neuropsychological Theory*. New York, Wiley.
- Huang E. J. y Reichardt L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- Huff N. C., Frank M., Wright-Hardesty K., Sprunger D., Matus-Amat P., Higgins E. y Rudy J. W. (2006). Amygdala regulation of immediate-early gene expression

in the hippocampus induced by contextual fear conditioning. *J Neurosci* Feb 1; 26(5): 1616-23.

Igaz L. M., Bekinschtein P., Izquierdo I. y Medina J. H. (2004). One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKIIalpha, Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. *Brain Res Mol Brain Res* 132(1): 1-12.

Igaz L. M., Vianna M. R., Medina J. H. y Izquierdo I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear motivated learning. *J Neurosci* 22(15): 6781-9.

Izquierdo I. (1989). Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol* 51(2): 171-202.

Izquierdo I., Barros D. M., Mello e Souza T., de Souza M. M., Izquierdo L. A. y Medina J. H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393(6686): 635-6.

Izquierdo I., Bevilaqua L. R., Rossato J. I., Bonini J. S., Medina J. H. y Cammarota M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29(9): 496-505.

Izquierdo I. y Medina J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68(3): 285-316.

- Izquierdo I., Medina J. H., Vianna M. R., Izquierdo L. A., Barros D. M. (1999).
Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*
103(1): 1-11.
- Johnston A. N. y Rose S. P. (2001). Memory consolidation in day-old chicks requires
BDNF but not NGF or NT-3; an antisense study. *Brain Res Mol Brain Res*
88(1-2): 26-36.
- Judge M. E. y Quartermain D. (1982). Characteristics of retrograde amnesia following
reactivation of memory in mice. *Physiol Behav* 28(4): 585-590.
- Kaczmarek L., Lapinska-Dzwonek J. y Szymczak S. (2002). Matrix metalloproteinases
in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of
neuronal connections? *EMBO J* 21(24):6643-8
- Kandel E. R., Schwartz J. H. y Jessell T. M. (1996). Principles of neural science.
- Kandel E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between
genes and synapses. *Science* 294(5544): 1030-8.
- Kang D. K., Kim K. O., Lee S. H., Lee Y. S. y Son H. (2000). c-Fos expression by
dopaminergic receptor activation in rat hippocampal neurons. *Mol Cells* 10:
546-551.
- Kelleher R. J., 3rd, Govindarajan A., Jung H. Y., Kang H. y Tonegawa S. (2004).
Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and
memory. *Cell* 116(3): 467-79.

- Kim J. J. y Baxter M. G. (2001). Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends Neurosci* 24(6): 324-330.
- Kobayashi Y. y Amaral D. G. (2003). Macaque monkey retrosplenial cortex: II. Cortical afferents. *J Comp Neurol*. 466(1):48-79.
- Kobayashi Y. y Amaral D. G. (2007). Macaque monkey retrosplenial cortex: III. Cortical efferents. *J Comp Neurol*. 502(5):810-33.
- Kubik S., Miyashita T. y Guzowski J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem*. 14(11):758-70
- Küppers E. y Beyer C. (2001). Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport*. 12(6):1175-9.
- Kwapis J. L., Jarome T. J., Lonergan M. E. y Helmstetter F. J. (2009) Protein kinase Mzeta maintains fear memory in the amygdala but not in the hippocampus. *Behav Neurosci*. 123(4):844-50.
- Lamprecht R. y Dudai Y. (1996). Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem* 3: 31–41.
- Lamprecht R. y LeDoux J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5, 45-54.

- Lanahan A. y Worley P. (1998). Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem* 70, 37-43.
- Lee J. L., Everitt B. J. y Thomas K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304(5672): 839-43.
- Liu I. Y., Lyons W. E., Mamounas L. A. y Thompson R. F. (2004). Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J Neurosci* 24(36): 7958-63.
- Locatelli F., Maldonado H. y Romano A. (2002). Two critical periods for cAMPdependent protein kinase activity during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 77(2): 234-49.
- Lu Y., Christian K. y Lu B. (2008). BDNF: A key regulator for protein synthesis dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem*. 89(3):312-23.
- MacLEAN P. D. (1949). Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosom Med*. 11(6):338-53
- Madroñal N., Gruart A., Sacktor T. C. y Delgado-García J. M. (2010). PKMzeta inhibition reverses learning-induced increases in hippocampal synaptic strength and memory during trace eyeblink conditioning. *PLoS One*. 5(4):e10400

- Maguire E. A. (2001). The retrosplenial contribution to human navigation: a review of lesion and neuroimaging findings. *Scand J Psychol.* 42(3):225-38.
- Maviel T., Durkin T. P., Menzaghi F. y Bontempi B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305(5680): 96-9.
- McAllister A. K., Katz L. C. y Lo D. C. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 295-318.
- McGaugh J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science* 287(5451): 248-51.
- McGaugh J. L.(2004). Memory reconsolidation hypothesis revived but restrained: theoretical comment on Biedenkapp and Rudy (2004). *Behav Neurosci.* 118(5):1140-2.
- Meighan S. E., Meighan P. C., Choudhury P., Davis C. J., Olson M. L., Zornes P. A., Wright J. W. y Harding J. W. (2006). Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity. *J Neurochem.* 96(5):1227-41.
- Meighan P. C., Meighan S. E., Davis C. J., Wright J. W. y Harding J.W. (2007). Effects of matrix metalloproteinase inhibition on short- and long-term plasticity of schaffer collateral/CA1 synapses. *J Neurochem.* 102(6):2085-96.
- Migues P. V., Hardt O., Wu D. C., Gamache K., Sacktor T. C., Wang Y. T. y Nader K. (2010). PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 13(5):630-4.

- Milekic M. H. y Alberini C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron* 36(3): 521-525.
- Mileusnic R., Anokhin K. y Rose S.P. (1996). Antisense oligodeoxynucleotides to c-fos are amnestic for passive avoidance in the chick. *Neuroreport*. May 17;7(7):1269-72.
- Miller M. W. y Vogt B. A. (1984). Direct connections of rat visual cortex with sensory, motor, and association cortices. *J Comp Neurol*. 226(2):184-202.
- Miniaci M. C., Kim J. H., Puthanveetil S. V., Si K., Zhu H., Kandel E. R. y Bailey C. H. (2008) Sustained CPEB-dependent local protein synthesis is required to stabilize synaptic growth for persistence of long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* 59:1024–1036.
- 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(827): 554-555.
- Miyashita T., Kubik S., Lewandowski G. y Guzowski J. F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 89:269–284.
- Mizuno M., Yamada K., Olariu A., Nawa H. y Nabeshima T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci* 20(18): 7116-21.

- Mizuno K. y Giese K. P. (2005). Hippocampus-dependent memory formation: do memory type-specific mechanisms exist? *J Pharmacol Sci.* 98(3): 191-7.
- Montarolo P. G., Goelet P., Castellucci V. F., Morgan J., Kandel E. R. y Schacher S. (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234(4781): 1249-54.
- Monteggia L. M., Barrot M., Powell C. M., Berton O., Galanis V., Gemelli T., Meuth S., Nagy A., Greene R. W. y Nestler E. J. (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10827-32.
- Morris R., Petrides M. y Pandya D. N. (1999). Architecture and connections of retrosplenial area 30 in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Eur J Neurosci.* 11(7):2506-18.
- Morris R. G., Inglis J., Ainge J. A., Olverman H. J., Tulloch J., Dudai Y. y Kelly P. A. (2006). Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50(3): 479-89.
- Morrow B. A., Elsworth J. D., Inglis F. M. y Roth R. H. (1999). An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced immobility. *J Neurosci.* 19(13): 5666-73.

- Muller G. E. y Pilzecker A. (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. Z. Psychol. Ergänzungsband 1: 1-300.
- Myers K. M. y Davis M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* 36(4): 567-584.
- Nader K., Schafe G. E. y Le Doux J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406(6797): 722-726.
- Nagy V., Bozdagi O., Matynia A., Balcerzyk M., Okulski P., Dzwonek J., Costa RM., Silva A. J., Kaczmarek L, y Huntley G. W. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci.* 26(7):1923-34.
- Nagy V., Bozdagi O. y Huntley G. W. (2007). The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory. *Learn Mem.* 14(10):655-64.
- O'Keefe J. y Nadel L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford, Oxford University Press.
- Okulski P., Jay T. M., Jaworski J., Duniec K., Dzwonek J., Konopacki F. A., Wilczynski G. M., Sánchez-Capelo A., Mallet J. y Kaczmarek L. (2007). TIMP-1 abolishes MMP-9-dependent long-lasting long-term potentiation in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry.* 62(4):359-62.

- Ou L. C. y Gean P. W. (2006). Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. *Neuropsychopharmacology* 31(2): 287-96.
- Ou L. C., Yeh S. H. y Gean P. W. (2010). Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiol Learn Mem.* Mar;93(3): 372-82.
- Papez J. W. (1937). A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 7(1):103-12.
- Parsons R. G. y Davis M. (2011). Temporary disruption of fear-potentiated startle following PKM ζ inhibition in the amygdala. *Nat Neurosci.*
- Pastalkova E., Serrano P., Pinkhasova D., Wallace E., Fenton A. A. y Sacktor T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313(5790): 1141-4.
- Paxinos G. y Watson C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Elsevier Ltd. 1: 33-37.
- Pedreira M. E., Dimant B., Tomsic D., Quesada-Allue L. A. y Maldonado H. (1995). Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 52(2): 385-95.
- Pedreira M. E., Perez-Cuesta L. M. y Maldonado H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein

- synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22(18): 8305-8311.
- Pedreira M. E. y Maldonado H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38(6): 863-869.
- Poo M. M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2(1): 24-32.
- Pothuizen H. H., Davies M., Aggleton J. P. y Vann S. D. (2010). Effects of selective granular retrosplenial cortex lesions on spatial working memory in rats. *Behav Brain Res* 208(2):566-75.
- Pothuizen H. H., Davies M., Albasser M. M., Aggleton J. P. y Vann S. D. (2009). Granular and dysgranular retrosplenial cortices provide qualitatively different contributions to spatial working memory: evidence from immediate-early gene imaging in rats. *Eur J Neurosci* 30(5):877-88.
- Pezawas L., Verchinski B. A., Mattay V. S., Callicott J. H., Kolachana B. S., Straub R. E., Egan M. F., Meyer-Lindenberg A. y Weinberger D. R. (2004). The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci* 24(45): 10099-102.
- Poo, M. M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2(1): 24-32.
- Qiao X., Chen L., Gao H., Bao S., Hefti F., Thompson R. F. y Knusel B. (1998). Cerebellar brain-derived neurotrophic factor-TrkB defect associated with

impairment of eyeblink conditioning in Stargazer mutant mice. *J Neurosci* 18(17): 6990-9.

Quevedo J., Vianna M. R., Roesler R., de-Paris F., Izquierdo I. y Rose S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem* 6(6): 600-7.

Radwanska A., Debowska W., Liguz-Leczna M., Brzezicka A., Kossut M. y Cybulska-Klosowicz A. (2010). Involvement of retrosplenial cortex in classical conditioning. *Behav Brain Res.* 214(2): 231-9.

Rattiner L. M., Davis M., French C. T. y Ressler K. J. (2004). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci* 24(20): 4796-806.

Redburn J. L. y Leah J. D. (1997). Accelerated breakdown and enhanced expression of c-Fos in the rat brain after noxious stimulation. *Neurosci Lett* 237: 97-100.

Rempel-Clower N. L., Zola S. M., Squire L. R. y Amaral D. G. (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J Neurosci.* 16(16):5233-55.

Restivo L., Vetere G., Bontempi B. y Ammassari-Teule M. (2009). The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 29:8206-8214.

- Riccio A., Alvania R. S., Lonze B. E., Ramanan N., Kim T., Huang Y., Dawson T. M., Snyder S. H. y Ginty D. D. (2006). A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* 21(2): 283-94.
- Rosenblum K., Meiri N. y Dudai Y. (1993). Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59(1): 49-56.
- Rossato J. I., Bevilaqua L. R., Izquierdo I., Medina J. H. y Cammarota M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325:1017–1020.
- Routtenberg A. y Rekart J. L. (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends Neurosci* 28(1): 12-9.
- Sacco T. y Sacchetti B. (2010). Role of secondary sensory cortices in emotional memory storage and retrieval in rats. *Science*. 329(5992):649-56.
- Sacktor T. C., Osten P., Valsamis H., Jiang X., Naik M. U., Sublette E. (1993). Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(18):8342-6.
- Sara S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7(2): 73-84.
- Schafe G. E., Atkins C. M., Swank M. W., Bauer E. P., Sweatt J. D. y LeDoux J. E. (2000a). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20(21): 8177-87.

- Schafe G. E. y LeDoux J. E. (2000b). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20(18): RC96.
- Scharf M. T., Woo N. H., Lattal K. M., Young J. Z., Nguyen P. V. y Abel T. (2002). Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *J Neurophysiol* 87(6): 2770-7.
- Scoville W. B. y Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurochem* 20(1): 11-21.
- Selcher J. C., Atkins C. M., Trzaskos J. M., Paylor R. y Sweatt J. D. (1999). A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem* 6(5): 478-90.
- Shema R., Sacktor T. C. y Dudai Y. (2007). Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317(5840): 951-3.
- Shema R., Hazvi S., Sacktor T. C., Dudai Y. (2009). Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex. *Learn Mem.* 16(2):122-8
- Shimizu E., Tang Y. P., Rampon C. y Tsien J. Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290; 1170–1174.
- Silva A. J., Kogan J. H., Frankland P. W. y Kida S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21: 127-48.

- Smeyne R. J., Vendrell M., Hayward M., Baker S. J., Miao G. G., Schilling K., Robertson L. M., Curran T. y Morgan J. I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363: 166–169.
- Squire L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99(2): 195-231.
- Squire L. R. y Zola S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 13515-13522.
- Sutherland R. J., Whishaw I. Q. y Kolb B. (1988). Contributions of cingulate cortex to two forms of spatial learning and memory. *J Neurosci.* 8(6):1863-72.
- Sutherland R. J., Dringenberg H. C. y Hoising J. M. (1993). Induction of long-term potentiation at perforant path dentate synapses does not affect place learning or memory. *Hippocampus.* 3(2):141-7.
- Sweatt J. D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14(3): 311-7.
- Taubenfeld, SM, Milekic, MH, Monti, B, Alberini, CM (2001a). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nat Neurosci* 4(8): 813-818.
- Taubenfeld S. M., Wiig K. A., Monti B., Dolan B., Pollonini G. y Alberini C. M. (2001b). Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP

response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. *J Neurosci* 21(1): 84-91.

Teng E. y Squire L. R. (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature*. 400(6745):675-7.

Tischmeyer W. y Grimm R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55:564–574.

Tokuyama W., Okuno H., Hashimoto T., Xin Li Y. y Miyashita Y. (2000). BDNF upregulation during declarative memory formation in monkey inferior temporal cortex. *Nat Neurosci* 3(11): 1134-42.

Tolwani R. J., Buckmaster P. S., Varma S., Cosgaya J. M., Wu Y., Suri C. y Shooter E. M. (2002). BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience* 114(3):795-805.

Trifilieff P., Herry C., Vanhoutte P., Caboche J., Desmedt A., Riedel G., Mons N. y Micheau J. (2006). Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem* 13(3): 349-58.

Tse D., Langston R. F., Kakeyama M., Bethus I., Spooner P. A., Wood E. R., Witter M. P. y Morris R. G. (2007). Schemas and memory consolidation. *Science* 316(5821): 76-82.

Tulving E. (1983). *Elements of Episodic Memory*. NY, USA, Oxford University Press.

- Tyler W. J., Alonso M., Bramham, C. R. y Pozzo-Miller L. D. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9(5): 224-37.
- Tyler W. J. y Pozzo-Miller L. D. (2001). BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 21(12): 4249-58.
- Valenstein E., Bowers D., Verfaellie M., Heilman K. M., Day A. y Watson R. T. (1987). Retrosplenial amnesia. *Brain*. 110 (Pt 6):1631-46.
- Valenstein M., Dalack G., Blow F., Figueroa S., Standiford C. y Douglass A. (1997). Screening for psychiatric illness with a combined screening and diagnostic instrument. *J Gen Intern Med*. 12(11):679-85.
- Van Groen T. y Wyss J. M. (1990). Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol*. 302(3):515-28.
- Van Groen T. y Wyss J. M. (1992). Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. *J Comp Neurol*. 315(2):200-16.
- Van Groen T. y Wyss J. M. (2003). Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J Comp Neurol*. 463(3):249-63.
- Vanderwolf C. H., Leung L. W. y Cooley R. K. (1985). Pathways through cingulate, neo- and entorhinal cortices mediate atropine-resistant hippocampal rhythmical slow activity. *Brain Res*. 347(1):58-73.

- Vann S. D. y Aggleton J. P. (2002). Extensive cytotoxic lesions of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory. *Behav Neurosci.* 116(1):85-94.
- Vann S. D. y Aggleton J. P. (2004). Testing the importance of the retrosplenial guidance system: effects of different sized retrosplenial cortex lesions on heading direction and spatial working memory. *Behav Brain Res.* 155(1):97-108.
- Vann S. D., Aggleton J. P. y Maguire E. A. (2009). What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci.* 2009 Nov;10(11):792-802.
- Vann S. D., Brown M. W. y Aggleton J. P. (2000). Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. *Neuroscience.* 101(4):983-91.
- Viola H., Furman M., Izquierdo L. A., Alonso M., Barros D. M., de Souza M. M., Izquierdo I. y Medina J. H. (2000). Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: Effect of novelty. *J Neurosci* 20: RC112.
- Vogt B.A., Absher J.R. y Bush G. (2000). Human retrosplenial cortex: where is it and is it involved in emotion? *Trends Neurosci.* 23(5):195-7.
- Vogt B. A , Sikes R. W., Swadlow H. A. y Weyand T. G. (1986). Rabbit cingulate cortex: cytoarchitecture, physiological border with visual cortex, and afferent cortical connections of visual, motor, postsubicular, and intracingulate origin. *J Comp Neurol.* 248(1):74-94.

- von Kraus L. M., Sacktor T. C. y Francis J. T. (2010). Erasing sensorimotor memories via PKMzeta inhibition. *PLoS One*. 5(6):e11125.
- Wang X. B., Bozdagi O., Nikitczuk J. S., Zhai Z. W., Zhou Q. y Huntley G. W. (2008). Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(49):19520-5.
- Wang H., Hu Y. y Tsien J. Z. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol*. 79(3):123-35.
- Warburton E. C., Baird A., Morgan A., Muir J. L. y Aggleton J. P. (2001). The conjoint importance of the hippocampus and anterior thalamic nuclei for allocentric spatial learning: evidence from a disconnection study in the rat. *J Neurosci*. 21(18):7323-30.
- Whitlock J. R., Heynen A. J., Shuler M. G. y Bear M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313(5790): 1093-7.
- Wiediger R. V. y Wright J. W. (2009) Influence of dorsal hippocampal lesions and MMP inhibitors on spontaneous recovery following a habituation/classical conditioning head-shake task. *Neurobiol Learn Mem*. 92(4):504-11.
- Wittenberg G. M., Sullivan M. R. y Tsien J. Z. (2002). Synaptic reentry reinforcement based network model for long-term memory consolidation. *Hippocampus* 12(5): 637-47.

- Wright J. W., Brown T. E. y Harding J. W. (2007). Inhibition of hippocampal matrix metalloproteinase-3 and -9 disrupts spatial memory. *Neural Plast* 2007:73813.
- Wyss J. M. y Van Groen T. (1992). Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. *Hippocampus*. 2(1):1-11.
- Yasoshima Y., Sako N., Senba E. y Yamamoto T. (2006). Acute suppression, but not chronic genetic deficiency, of c-fos gene expression impairs long-term memory in aversive taste learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7106-11.
- Yefet K., Merhav M., Kuulmann-Vander S., Elkobi A., Belevsky K., Jacobson-Pick S., Meiri N. y Rosenblum K. (2006). Different signal transduction cascades are activated simultaneously in the rat insular cortex and hippocampus following novel taste learning. *Eur J Neurosci* 24(5): 1434-42.