

## Tesis de Posgrado

# Participación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) en la formación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus*

Locatelli, Fernando F.

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Locatelli, Fernando F.. (2003). Participación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) en la formación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3556\\_Locatelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3556_Locatelli.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Locatelli, Fernando F.. "Participación de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) en la formación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3556\\_Locatelli.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3556_Locatelli.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Participación de la proteína quinasa dependiente  
de AMP cíclico (PKA) en la formación de la  
memoria de largo término en *Chasmagnathus***

Tesis para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas

**Autor: Lic. Fernando F. Locatelli**  
**Director: Dr. Arturo G. Romano**

Laboratorio de Neurobiología de la Memoria  
Departamento de Fisiología, Biología  
Molecular y Celular

Marzo 2003

*A Pato,  
Haydeé, Fernando  
Anasol y Celeste*

## *Agradecimientos*

*Agradezco a la Universidad de Buenos Aires y en especial al programa de becas para formación profesional. Por mi parte, haber llegado a completar esta tesis y el máximo esfuerzo dedicado a ella, constituye un fuerte voto de convicción en favor de la importancia de este tipo de programas y de la universidad pública.*

*Agradezco profundamente a mi director de tesis, Arturo Romano, por transmitirme su experiencia, por toda su dedicación y por enseñarme además de biología a trabajar con responsabilidad y disfrutando de lo que se hace. Agradezco y valoro infinitamente su confianza depositada en mi.*

*A Héctor Maldonado, por haber seguido de cerca, con profundo interés y entusiasmo los pasos de esta tesis. Agradezco todo su apoyo brindado y enseñarme la riqueza de las preguntas biológicas.*

*El balance de estos años no sería el mismo si a la culminación de esta tesis no pudiera sumar la amistad del equipo de personas que trabaja en el laboratorio de neurobiología de la memoria. Muchos de ellos participaron en los experimentos, Alejandro Delorenzi, Ramiro Freudenthal, Carlos Lafourcade, Emiliano Merlo, Darío Lemos, y junto con Daniel Tomsic, Angel Vidal, Martín Berón, Gabriela Hermitte, Beatriz Dimant, Maria E. Pedreira, Lia Frenkel, Mariana Feld, Julieta Starcker, Luis Perez Cuesta, brindaron un ambiente de trabajo, de discusión, compañerismo y de calidad humana increíble.*

*Agradezco a mi familia, Haydee, Fernando, Anasol y Celeste que me apoyaron incondicionalmente y sé que lo seguirán haciendo. Ellos acompañaron, sufrieron y festejaron conmigo cada uno de los pasos en esta etapa.*

*Quiero agradecer al resto de amigos que empujaron durante estos años, que alimentaron la inquietud y ganas por hacer y en los que siempre encontré apoyo, Leo Clerici, Gabriel Bibbo, Juan Ianowski, Hernán Boccalandro, Rodrigo DeMarco, Paola Favre, Verónica Campanucci, Juliana Jiménez, Ximena Pastorino, Tomas Falzone, Gisela Delville, a los que mencioné anteriormente y a los que me perdonan porque los estoy olvidando.*

*Fue fundamental el apoyo de Martha y Héctor Fernández, Susana y Marta Locatelli, Beatriz y Benjamín Rodríguez.*

*Agradezco a las Drs Silvia Moreno y Cristina Paveto y al Dr. Uli Müller, que siempre atendieron mis inquietudes amablemente. A Germán Szapiro que desinteresadamente dedicó su tiempo a ensayos con cangrejos.*

*Agradezco a las personas responsables del apoyo técnico y de los recursos provistos por el viejo departamento de Ciencias Biológicas y el nuevo departamento de Fisiología, Biología, Molecular y Celular.*

*A todo aquel que lea esta tesis, gracias por su interés y por su tiempo.*

*Gracias a Pato por todo su amor.*



## Resumen

Las hipótesis para el estudio de las bases neurobiológicas del aprendizaje y la memoria consideran que la información es almacenada por el sistema nervioso como cambios en las conexiones entre neuronas. Estos cambios son el resultado de un proceso de transformación inducido por la experiencia y dirigido en cada neurona por la activación de las vías de transducción, que por medio de la acción de quinasas, regulan cambios de corto término y la expresión de genes responsables de los cambios perdurables que subyacen la memoria de largo término. En la presente tesis se estudió la participación de la proteína quinasa dependiente de AMP-cíclico (PKA) en la formación de una memoria de largo término y aspectos de su activación fueron estudiados en estrecha relación con la experiencia y el tipo de memoria inducido. Con este objetivo se utilizó el paradigma de memoria contexto-señal del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, en el cual el animal aprende a reconocer la inocuidad de un estímulo inicialmente peligroso. Ante la falta de conocimiento previo sobre esta vía de transducción en crustáceos, se estudió la distribución de la actividad basal y total de PKA en sistema nervioso de cangrejo y se identificó y caracterizó a las isoformas I y II de la misma. Mediante la administración de un inhibidor de PKA, a distintos tiempo respecto del entrenamiento, se determinó la existencia de dos períodos en los cuales la actividad de PKA es fundamental para la consolidación. El primero durante el entrenamiento y el segundo en una ventana temporal entre 4 y 8 horas después del mismo. La medición de la actividad de PKA durante la consolidación permitió comprobar que la activación de PKA es parte de los mecanismos de la consolidación directamente inducidos por la experiencia. Se determinó que durante el segundo período de dependencia de PKA para la consolidación existe un aumento de la isoforma de PKA más sensibles al AMPc, PKA I, que estaría involucrado en el aumento de actividad de PKA necesario durante esa etapa de la consolidación. Finalmente, se estudió que aspectos temporales y mecanísticos de la activación de PKA son función específica de la activación inducida por distintas experiencias. La participación diferencial de isoformas de PKA es sugerida.

## **Abstract**

Current hypothesis for the study of neurobiological basis of learning and memory consider that information provided by experience is encoded as changes in the connections between neurons. These changes are consequence of a transformation process initiated by the experience and directed by coordinate action of signal transduction pathways. Through phosphorylation, kinases regulate short-term synaptic changes and the expression of genes involved in the plastic changes that underlie the long-term memory. Works at this thesis were aimed at studying the role of cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) on long-term memory formation and specific aspects of its activation were studied in relation with the kind of experience and the memory induced. The experimental model used was the context-signal learning paradigm of *Chasmagnathus granulatus* crab. The lack of previous information about the cAMP pathway in crustaceans prompted us first to characterize PKA from crab neural tissues. Basal and total PKA activity distribution was studied in the crab neural system and we also identified and characterized PKA isoforms I and II. Using *in vivo* administration of a PKA inhibitor at different times from training, two periods of PKA dependence were determined for memory consolidation. The first of them during training session and a second one in a time window from 4 to 8 hours after training. PKA activity was measured in neural ganglia after training revealing that PKA activation is part of mechanisms directly induced by experience and involved in consolidation. Coincidentally with the second PKA dependence period, an increase in the more sensible isoform, PKA I, was found. This increase could be responsible for the PKA activity necessary during this period. Finally, temporal and mechanistic aspects of PKA activation were found to be specific functions of the activation induced by different experiences that induce different memories. Differential PKA isoform participation is also suggested.

# Índice

## CAPÍTULO I

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Comportamiento, aprendizaje y memoria</b>	<b>3</b>
1.1.1 Criterios para la clasificación de memorias	4
<b>1.2 Bases celulares de la memoria, la plasticidad neuronal</b>	<b>4</b>
1.2.1 La naturaleza del cambio sináptico	6
1.2.2 El origen de los cambios	9
<b>1.3 Vías de transducción de señales, fosforilación de proteínas y plasticidad neuronal</b>	<b>10</b>
1.3.1 Transducción de la información	10
1.3.2 Proteínas Quinasas	11
1.3.3 Interacción entre vías de transducción	12
1.3.4 Vías de transducción y plasticidad neuronal	12
<b>1.4 El proceso de formación de memoria</b>	<b>13</b>
1.4.1 Fases de la memoria	13
1.4.2 Etapas en el proceso de formación de memoria	15
1.4.3 Modulación de la memoria	16
1.4.4 Consolidación de la memoria	17
1.4.5 El estudio de la consolidación a nivel celular	19
1.4.5.1 Vía de la PKC y memoria	20
1.4.5.2 Vía de las CaM Quinasas y memoria	21
1.4.5.3 Vía de la MAPK y memoria	22
1.4.5.4 Tirosina-quinasa y memoria	23
<b>1.5 Vía del AMPc y PKA</b>	<b>24</b>
1.5.1 Adenilato ciclasa	25
1.5.1.1 Activación por neurotransmisores	25
1.5.1.2 Modulación de AC por Ca <sup>2+</sup>	27
1.5.2 Adenilato Ciclasa en aprendizaje y memoria	28
1.5.3 La actividad de AC como punto de relevo o de decisión	29
1.5.4 AMP cíclico	30
1.5.5 AMP cíclico, aprendizaje y memoria	31
1.5.6 Aceptores intracelulares de AMP cíclico	32

1.5.7	Proteína Quinasa dependiente de AMPc (PKA)	33
1.5.8	PKA y memoria	35
<b>1.6</b>	<b>El modelo de memoria usado en esta tesis</b>	<b>40</b>
1.6.1	El Sistema Nervioso Central en Decápodos	42
1.6.2	El sistema sanguíneo intraganglionar	46
1.6.3	El paradigma de aprendizaje	46
1.6.4	Caracterización farmacológica de dos procesos de memoria	49
1.6.5	Papel de la vía AMPc-PKA en la formación de MCS	51
<b>1.7</b>	<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>53</b>
<b>CAPITULO II</b>		
<b>MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....</b>		<b>57</b>
<b>2.1</b>	<b>Animales, procedencia, mantenimiento</b>	<b>59</b>
2.1.1	Animales	59
2.1.2	Lugar de captura	59
2.1.3	Mantenimiento de los animales	60
<b>2.2</b>	<b>Comportamiento y medición</b>	<b>60</b>
2.2.1	La respuesta de escape	60
2.2.2	Estimulación y registro de la respuesta de escape	61
2.2.3	Ensayo de estimulación	62
<b>2.3</b>	<b>Procedimientos de entrenamiento y evaluación</b>	<b>63</b>
2.3.1	Criterio de selección de los animales	63
2.3.2	Protocolo de entrenamiento espaciado	64
2.3.3	Protocolo de entrenamiento masivo	64
<b>2.4</b>	<b>Evaluación de la retención</b>	<b>65</b>
<b>2.5</b>	<b>Definiciones</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO III</b>		
<b>CURSO TEMPORAL DE LA ACCIÓN DE PKA EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA CONTEXTO-SEÑAL EN <i>CHASMAGNATHUS</i></b>		<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Introducción</b>	<b>69</b>
<b>3.2</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>71</b>
3.2.1	Drogas e inyecciones	71

3.2.2 Procedimiento experimental	72
3.2.3 Evaluación de la retención y del efecto amnésico	73
<b>3.3 Resultados</b>	75
3.3.1 La inhibición de PKA durante el entrenamiento disrumpe el proceso de consolidación de la memoria contexto-señal	75
3.3.2 Existe un segundo periodo posterior al entrenamiento en el cual la memoria es sensible a la inhibición de PKA	81
3.3.3 La inhibición de PKA no interfiere con la evocación	86
3.3.4 La inhibición de PKA no impide la formación de memoria señal inducida por un entrenamiento masivo	87
<b>3.4 Discusión</b>	89
3.4.1 Curso temporal de la acción de PKA durante la consolidación	90
3.4.1.1 PKA durante la adquisición	90
3.4.1.2 Segundo período de activación de PKA	93
3.4.1.3 La evocación es independiente de PKA	93
3.4.2 La activación de PKA no es un requerimiento común de todos los procesos mnésicos en <i>Chasmagnathus</i>	94
3.4.3 Disección de la memoria contexto-señal y la memoria señal	95
 <b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CÍCLICO EN SISTEMA NERVIOSO DE <i>CHASMAGNATHUS</i> - MEDICIÓN DE SU ACTIVACIÓN</b>	97
 <b>4.1 Introducción</b>	99
<b>4.2 Materiales y métodos</b>	100
4.2.1 Preparación de tejidos y extractos	100
4.2.2 Ensayo de proteína quinasa	101
<b>4.3 Resultados</b>	102
4.3.1 Medición de actividad PKA en <i>Chasmagnathus</i>	102
4.3.2 PKA en sistema nervioso de <i>Chasmagnathus</i>	105
4.3.3 Medición de la activación de PKA	107
4.3.3.1 Congelamiento de la muestra y revelado por autoradiografía	107
4.3.3.2 Medición de la activación en papel de fosfocelulosa	111
4.3.3.3 Medición de activación in vivo	114
<b>4.4 Discusión</b>	115
4.4.1 Actividad basal y total de PKA	116
4.4.2 Distribución diferencial de PKA	116

4.4.3 Moduladores endógenos de la actividad de PKA	118
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>EL ENTRENAMIENTO Y LA EXPOSICIÓN AL CONTEXTO INDUCEN LA ACTIVACIÓN DE PKA EN GANGLIO SUPRAESOFÁGICO</b>	121
5.1 Introducción	123
5.2 Materiales y Métodos	125
5.2.1 Tratamientos	125
5.2.2 Extractos	126
5.2.3 Ensayo de Fosforilación	127
5.3 Resultados	130
5.3.1 El entrenamiento y la exposición a un contexto nuevo inducen aumento de la actividad basal de PKA	130
5.3.2 El entrenamiento y no la exposición al contexto induce aumento de la actividad basal de PKA 6 horas después de la experiencia	132
5.3.3 Valores normales de actividad de PKA 24 horas después de la experiencia	133
5.4 Discusión	135
5.4.1 Animales Entrenados	137
5.4.2 Animales expuestos al contexto	139
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ISOFORMAS DE PKA EN SISTEMA NERVIOSO DE <i>CHASMAGNATHUS</i></b>	143
6.1 Introducción	145
6.2 Materiales y métodos	146
6.2.1 Preparación de extractos	146
6.2.2 Cromatografía de intercambio aniónico	147
6.2.3 Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i>	147
6.2.4 Ensayo de auto-fosforilación	148
6.2.5 Drogas	149
6.3 Resultados	149
6.3.1 Isoformas de PKA en <i>Chasmagnathus</i>	149
6.3.2 Sensibilidad de las isoformas de PKA a nucleótidos cíclicos	151

6.3.3 Auto - fosforilación de PKA II	154
<b>6.4 Discusión</b>	156
6.4.1 PKA I y PKA II en <i>Chasmagnathus</i>	156
6.4.2 Activación de PKA por GMPc	158
6.4.3 PKA I es más sensible a nucleótidos cíclicos que PKA II	158
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE PKA DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA</b>	161
<b>7.1 Introducción</b>	163
<b>7.2 Materiales y Métodos</b>	169
7.2.1 Tratamientos	169
7.2.2 Extractos	169
7.2.3 Cromatografía de intercambio aniónico	170
7.2.4 Ensayo de Fosforilación	171
7.2.5 Cantidad de cada isoforma	173
<b>7.3 Resultados</b>	174
7.3.1 La exposición al contexto de entrenamiento induce activación de la isoforma II de PKA inmediatamente después de la experiencia	174
7.3.2 Incremento en la isoforma I de PKA 6 horas después del entrenamiento	177
7.3.3 24 horas después del tratamiento se reestablecen las proporciones de holoenzima I y II de PKA	179
<b>7.4 Discusión</b>	181
7.4.1 Mecanismos distintos subyacen la activación de PKA inducida por el entrenamiento y por el contexto	181
7.4.1.1 Isoformas I y II de PKA	182
7.4.1.2 Activación de la subunidad catalítica de PKA independiente de cAMP	186
7.4.1.3 Especificidad mecanística	187
7.4.2 El aumento de los niveles de PKA I es responsable del aumento en actividad de PKA durante el segundo período de dependencia para la consolidación	188
7.4.2.1 Regulación de las subunidades de PKA	190
7.4.3 El cambio en la proporción de las isoformas es transitorio, restituyéndose los valores normales 24 horas después del entrenamiento	193

<b>CAPITULO VIII</b>	
<b>CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN GENERAL</b>	195
<b>8.1 Dos periodos de activación de PKA en la consolidación de la memoria</b>	199
<b>8.2 La activación de PKA es un mecanismo intrínseco de la consolidación de la memoria iniciado por la experiencia</b>	204
<b>8.3 Participación diferencial de isoformas de PKA en la consolidación</b>	207
<b>8.4 Aumento de la isoforma I de PKA en el segundo período de la consolidación</b>	209
<b>8.5 Variaciones en la proporción PKA I / PKA II</b>	210
<b>8.6 Substratos de PKA</b>	211
<b>8.7 Comentarios finales</b>	213
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	215

**Capítulo I**

# **Introducción**



## 1.1 Comportamiento, aprendizaje y memoria

El comportamiento de un animal cambia a lo largo de su vida como parte de un patrón genético de desarrollo y como producto de su interacción con el medio ambiente. Entre especies, el peso de cada uno de estos componentes en la determinación del comportamiento puede variar notablemente, sin embargo el límite entre los aspectos comportamentales derivados de uno y otro, no son claros, ya que las posibilidades de un animal de modificar su comportamiento en base a una experiencia son parte de sus habilidades cognitivas determinadas genéticamente y por experiencias previas que delinear sus posibilidades de interpretación y procesamiento de la información. Es por esto, que las habilidades cognitivas de un animal no pueden ser estudiadas sino es en función de las presiones ecológicas que llevaron a la plasticidad del comportamiento como una solución adaptativa.

Las teorías actuales, consideran al aprendizaje como la adquisición de predicciones específicas. Mediante ellas los animales aprenden a predecir el éxito o fracaso de sus actos, así como el significado o la consecuencia de una configuración de estímulos. Estas predicciones resultan adaptativas en la medida que permitan al animal modificar su comportamiento para recibir un estímulo positivo o a tiempo evitar un estímulo negativo (Rescorla & Wagner, 1972; Dickinson, 1980; Mackintosh, 1975; Pearce & Hall, 1980). Por esto, la capacidad de un animal de asimilar una experiencia, se evidencia a través de sus actos, como un hecho comportamental ante un estímulo, distinto al que hubiera hecho antes de la experiencia o al que haría un animal que no la ha vivido (Rescorla & Holland, 1976; Rescorla, 1988).

El objeto de estudio en esta tesis son los mecanismos que permiten a un animal asimilar la información existente en una experiencia y actuar en base a ella. Esto ocurre gracias a dos procesos, que definidos en su sentido mas amplio son: **el aprendizaje**, como al proceso a través del cual los animales adquieren información nueva acerca del medio ambiente; y **la memoria**, que se refiere al proceso por el cual la información adquirida es retenida para luego ser revelada (Thorpe, 1963).

### 1.1.1 Criterios para la clasificación de memorias

El estudio de pacientes amnésicos ha permitido identificar inicialmente la existencia de dos categorías de memorias con distintas propiedades y características de procesamiento (Squire, 1987): **La memoria explícita o declarativa**: es una forma de memoria conciente por la que se recuerdan personas, lugares, eventos,.. etc. Esta forma de memoria esta principalmente bien desarrollada en mamíferos y su existencia nos resulta evidente en humanos, ya que es la memoria que evocamos para referirnos y ser concientes de episodios del pasado.

La complejidad de los procesos declarativos ha llevado tradicionalmente desde un punto de vista humano a denominarlos como procesos de orden superior, y ha conducido a subestimar el poder y la riqueza de otras formas de **memoria no-declarativas o implícitas** (Menzel, 2001). Esta segunda categoría, son memorias de las cuales no somos concientes hasta que se evidencian por ejemplo por la presencia de habilidades motoras adquiridas. La **memoria no-declarativa** comprende formas de **memoria asociativa**, en las que el animal aprende la relación entre dos estímulos como un **condicionamiento clásico** o entre un estímulo y un comportamiento en el caso de un **condicionamiento operante**; y **memorias no asociativas** como ser **la sensibilización** y **la habituación** en las que el animal aprende las propiedades de un único estímulo aumentando o disminuyendo respectivamente la respuesta ante ellos. La adquisición de la **memoria no-declarativa** puede ocurrir sin ser concientes de ello. En general son adquiridas por repetición y se evidencian de manera automática sin un proceso deliberado de evocación.

## 1.2 Bases celulares de la memoria, la plasticidad neuronal

Las primeras reflexiones acerca de las bases fisiológicas del aprendizaje y la memoria surgieron a fines del siglo XIX, sugiriendo que algún cambio en la estructura del sistema nervioso sería responsable de la memoria. Varios autores de la época, William James (1890), Ramón y Cajal (1894), Tanzi (1893), Lugaro (1900) entre otros, basados en los conocimientos del momento

acerca de la incapacidad de las neuronas maduras de dividirse, coincidieron en proponer que la formación y persistencia de las memorias estaría relacionada con crecimiento y cambios de las neuronas (Squire, 1987).

Esta concepción de las bases celulares de la memoria dio lugar a dos teorías: a principios del siglo XX Pavlov fue uno de los primeros en proponer la **teoría conectivista** de la memoria, basada en que durante un proceso asociativo como un condicionamiento, nuevas conexiones eran formadas entre las vías sensoriales y motoras que estaban siendo asociadas. Alternativamente, la **teoría elemental** sostenía que los cambios consistían en la alteración de la transmisión entre elementos que ya estaban previamente conectados. Esta teoría recibió fuerte apoyo por Hebb (1949) quien además enunció adelantándose a las evidencias experimentales, que la eficacia de la transmisión sináptica entre dos elementos debía ser directamente dependiente de su uso.

Hoy en día, las evidencias han demostrado que la formación de conexiones entre neuronas que no estaban conectadas solo ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso como resultado de un programa genético y también de experiencias o estimulaciones tempranas, que como parte del desarrollo pueden inducir la eliminación o formación de conexiones. Por el contrario, los cambios responsables del aprendizaje y la memoria consisten en la modificación de la eficacia de transmisión entre elementos ya conectados. Durante el siglo XX la **teoría elemental** recibió fuerte sustento experimental y fue profundizada haciendo hincapié en que las sinapsis eran el sitio donde ocurrían los cambios (Konorski, 1948; Hebb, 1949; Eccles, 1953)

Las teorías actuales para el estudio de la memoria se basan en considerar que la memoria es un caso especial dentro de un fenómeno mas general del sistema nervioso que es la **plasticidad neuronal**. Muchas neuronas exhiben plasticidad, esto quiere decir que pueden sufrir modificaciones morfológicas y funcionales, que en algunos casos pueden ser duraderas. Esta plasticidad no es propia solo de los fenómenos de aprendizaje y memoria sino que también es evidente ante otros fenómenos como la tolerancia a drogas, el crecimiento

de terminales axonales después de una lesión e incluso en eventos estrictamente sinápticos tales como la depresión o facilitación sináptica.

Básicamente, la idea es que la memoria involucra cambios persistentes en la relación de conectividad entre neuronas, que pueden deberse a cambios estructurales, bioquímicos o fisicoquímicos. Estos cambios en la comunicación entre dos neuronas alteran el comportamiento de un circuito neuronal cuya consecuencia final es un cambio en el comportamiento del animal.

En otras palabras, si el comportamiento de un animal ante determinado patrón de estímulos puede ser explicado en términos de los circuitos involucrados en la percepción, procesamiento de la información, elaboración y ejecución de una respuesta, entonces los cambios observados en el comportamiento como producto de la experiencia se deben a cambios producidos a nivel de dichos circuitos. Sabiendo además que el comportamiento de un circuito es producto de la intrincada red de conexiones excitatorias e inhibitorias entre las neuronas que lo conforman, entonces las modificaciones en estas interconexiones son las determinantes de los cambios de comportamiento del circuito.

Eccles (1977) resume en términos generales, de acuerdo con Sherrington (1940), Adrian (1947), y Lashley (1950), que las memorias se hallan de algún modo codificadas en las conexiones neuronales del cerebro y específicamente según Eccles (1970) y Szentagothi (1971) que la base estructural de la memoria son las modificaciones a nivel de las sinapsis.

### **1.2.1 La naturaleza del cambio sináptico**

Muy brevemente se han discutido hasta aquí las teorías y la evolución de las ideas que ha llevado a la concepción actual de que la plasticidad del comportamiento es el resultado de la plasticidad morfológica y funcional de sistema nervioso.

A partir de aquí se abandona el terreno teórico para volver la mirada a las principales evidencias que apoyaron estas teorías y que revelaron los mecanismos responsables de dicha plasticidad.

Hasta el momento, los mecanismos celulares y moleculares que se ha comprobado participan del cambio en la comunicación entre neuronas que subyace el aprendizaje y memoria pueden ser agrupados en (Squire, 1987):

- a. cambios bioquímicos y biofísicos que alteran la eficacia sináptica;
- b. cambios morfológicos o estructurales que modifican el grado de conectividad entre dos neuronas

Se ha determinado que estos dos mecanismos participan diferencialmente en la solución de dos problemas críticos de la plasticidad sináptica: La incorporación de cambios rápidos y de expresión temprana; y la incorporación de cambios persistentes:

Los cambios responsables del almacenamiento de la información durante periodos inmediatos a la experiencia deben basarse en modificaciones rápidas de elementos ya presentes en la sinapsis en el momento de la experiencia. Como producto de un patrón específico de estimulación se inducen modificaciones post-transcripcionales rápidas, entre las cuales se encuentran la modulación de canales iónicos, la afinidad de receptores post-sinápticos, la síntesis y movilización de vesículas sinápticas a la zona activa de liberación, entre otras. Estas reacciones afectan directamente la eficacia sináptica aumentando o disminuyendo la habilidad de la neurona presináptica de liberar neurotransmisor o afectando la sensibilidad al neurotransmisor de la neurona post-sináptica.

Estas observaciones revelan que modificaciones post-transcripcionales inducidas por un patrón de estimulación pueden cambiar el comportamiento de una sinapsis y hacer a una neurona individual capaz de almacenar información al menos temporalmente.

Sin embargo, si el cambio en la transmisión sináptica entre dos neuronas es producto de un estado particular de excitabilidad inducido por un patrón específico de estimulación, la pregunta que surge es como ese estado particular de excitabilidad se mantiene en el tiempo cuando la estimulación que lo indujo ha cesado. O bien, ¿Cuales son los mecanismos responsables de los cambios persistentes en la conectividad entre dos neuronas? Para responder

esta pregunta es necesario considerar un mecanismo de tipo autosustentable e independiente de la actividad inicial que lo indujo.

La observación experimental de que las memorias estables y duraderas son dependientes de la síntesis proteica (Agranoff, 1972; Davis & Squire, 1984) y que las experiencias aumentan en el cerebro la incorporación de precursores de ARN y proteínas radiactivamente marcados (Dunn, 1980), dieron sustento a las hipótesis de que los cambios persistentes podían deberse a la expresión de proteínas nuevas que estabilizaran las modificaciones bioquímicas, biofísicas y estructurales (Squire, 1987).

Tres líneas independientes de investigación, basadas en distintos modelos para el estudio de la memoria y plasticidad sináptica, brindaron evidencias a favor la hipótesis de los cambios estructurales:

- a. En primer lugar que la arquitectura del cerebro es plástica. Por ejemplo se pueden observar cambios morfológicos debido a la experiencia; ratas expuestas a ambientes enriquecidos muestran en términos generales aumento en el espesor cortical, en el tamaño de los somas, en el número y longitud de las ramas dendríticas, diámetro de las sinapsis y cambio en el número y forma de las espinas dendríticas (Rosenzweig & Bennet, 1978; Greenough, 1984, Turner & Greenough, 1985).
- b. Un segundo grupo de evidencias proviene de las investigaciones hechas sobre el fenómeno de potenciación de largo término inicialmente descubierto y estudiado en hipocampo de mamíferos. Este fenómeno constituye un caso de plasticidad neuronal en el cual la eficiencia sináptica cambia de manera duradera después de un protocolo específico de estimulación. Dos tipos de cambios estructurales son responsables del mantenimiento de la potenciación a largo término: el aumento en el número de sinapsis y el cambio en la forma de las sinapsis ya existentes (Chang & Greenough, 1984; Lee et al., 1980).
- c. La tercera evidencia proviene de los estudios realizados en *Aplysia*, un molusco marino que provee de un modelo muy ventajoso y extensamente utilizado para el estudio de las bases celulares y moleculares de la

memoria. En *Aplysia* se han estudiado los mecanismos que subyacen la habituación y la sensibilización de una respuesta defensiva. Se ha comprobado que los entrenamientos correspondientes inducen respectivamente reducción y aumento estable en el número de las terminales pre-sinápticas de las neuronas sensoriales (Bailey & Chen, 1983).

### **1.2.2 El origen de los cambios**

En las secciones anteriores se ha desarrollado desde un punto de vista teórico y haciendo referencia en las principales comprobaciones experimentales, el concepto de que el aprendizaje y la memoria están representados en la eficacia de las sinapsis entre neuronas y en las consecuencias circuitales de esa distribución de pesos. Hasta aquí, se han mencionado entonces cuales son las causas del cambio en el comportamiento y de la capacidad de retener información.

Un aspecto de interés central para la neurobiología es que estas causas son a su vez consecuencia de un fenómeno dirigido de transformación, desde una configuración de pesos sinápticos anterior a la experiencia hasta una configuración posterior y específica a la misma. El estudio de esta transformación comprende a los mecanismos responsables de iniciar, regular, localizar y mantener los cambios sinápticos.

Es sabido que son las experiencias las que modelan el peso de las conexiones, y que a cada experiencia corresponde en una neurona un patrón propio de estimulación por neurotransmisores, neuromoduladores, etc. La neurona como unidad del cambio plástico, debe poseer la capacidad computacional de detectar patrones específicos de estimulación y de promover los cambios sinápticos correspondientes.

Para abordar estos interrogantes es necesario considerar cómo llega la información a la neurona y cómo esta es transferida y procesada en el interior de la misma.

## 1.3 Vías de transducción de señales, fosforilación de proteínas y plasticidad neuronal

### 1.3.1 Transducción de la información

Las neuronas reciben la información como señales químicas externas (neurotransmisores, neuromoduladores) que interactúan con receptores específicos de la célula. A grandes rasgos los receptores transfieren esta información alterando el potencial de membrana o el estado bioquímico de la célula. Básicamente los receptores pueden ser subdivididos en dos grandes categorías:

- a. **receptores ionotrópicos**, son los que a su vez cumplen función de canales iónicos y su interacción con el neurotransmisor tiene un efecto rápido que altera directamente la permeabilidad iónica, provocando cambios en el potencial eléctrico de la célula.
- b. **receptores metabotrópicos**, no son efectores directos sino que transfieren la información a la célula activando **vías de transducción** específicas. Estos receptores una vez activos interactúan con proteínas intracelulares que pueden regular la actividad de canales y/o iniciar una cascada de eventos bioquímicos con efectos específicos sobre el metabolismo celular y la expresión génica.

Los receptores metabotrópicos pueden ser divididos en receptores ligados a **proteínas G** y receptores **tirosina quinasa**. Los primeros, típicamente activan enzimas efectoras que producen **segundos mensajeros**. Estos constituyen señales difusibles en el interior de la célula que activan proteínas quinasas específicas o inducen la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios intracelulares al citoplasma cuya concentración es también determinante para la activación de enzimas, entre ellas quinasas y fosfatasas. Los receptores **tirosina quinasa** no involucran un segundo mensajero ya que el propio dominio intracelular del receptor posee actividad de quinasa. Una vez activo el receptor, este interactúa con proteínas efectoras o promueve la activación de otras quinasas que de manera secuencial activan una cascada bioquímica intracelular.

### 1.3.2 Proteínas Quinasas

Como se observa hasta aquí la activación de quinasas mediada por segundos mensajeros o directamente por receptores, constituye en evento fundamental en la transducción de información al interior de la célula.

Las proteínas quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del grupo fosfato  $\gamma$  de la adenosina trifosfato (ATP) a los grupos alcoholes de las serinas y treoninas y al grupo fenol de las tirosinas en las cadenas proteicas. Las fosfatasas regulan la actividad de la quinasas removiendo dichos grupos fosfato y produciendo fosfato inorgánico.

El valor de la fosforilación radica en que es una modificación post-transcripcional, rápida y reversible que provoca un cambio conformacional en la proteína alterando sus propiedades funcionales. Las fosforilaciones regulan la actividad de enzimas, receptores, canales iónicos y factores de transcripción entre otros. Por otro lado, la ventaja de la fosforilación es que puede ser muy precisamente controlada por la especificidad entre quinasas y substratos, y por el hecho de que las quinasas pueden ser reguladas reversiblemente entre un estado catalítico y uno inactivo.

Las quinasas y fosfatasas constituyen un punto estratégico de la regulación del metabolismo celular, donde el conjunto de señales externas es convertido dentro de la célula a un patrón específico de activación que regula el conjunto de respuestas de la célula por medio de la fosforilación de substratos que son efectores directos o reguladores de otros procesos.

En el sistema nervioso, se ha comprobado que las proteínas quinasas pueden regular eventos claves que son parte del proceso de plasticidad neuronal. La síntesis y liberación de neurotransmisores, la afinidad de los receptores post-sinápticos, la permeabilidad de los canales iónicos y la inducción de la expresión de genes que subyacen a los cambios de largo término responsables de la memoria, son ejemplos de mecanismos con importancia a corto y largo término regulados por el ajustado equilibrio de la actividad de quinasas y fosfatasas específicas.

### **1.3.3 Interacción entre vías de transducción**

Hasta aquí se ha presentado a las vías de transducción como sistemas de transmisión de información de tipo vertical, donde un receptor de membrana activa una vía de transducción, la cual induce la activación de una o varias quinasas correspondientes y estas fosforilan los substratos respectivos.

Sin embargo la acción regulatoria de las vías de transducción se amplifica horizontalmente por interacción entre distintas vías. La interacción puede darse bien por acción paralela, convergente o antagónica y ocurrir a distintos niveles de las vías, desde la producción de los segundos mensajeros a la activación de quinasas y a nivel de los substratos. De esta manera la acción de una vía de transducción puede ser modulada por la acción de otra.

De esta posibilidad de interacción emerge el hecho de que la acción conjunta de dos o mas vías de transducción con una relación temporal, espacial y de intensidad dada, induzca en la célula un patrón propio de activación y una respuesta específica.

### **1.3.4 Vías de transducción y plasticidad neuronal**

Volviendo al interrogante inicial de esta sección, acerca de la identidad de los mecanismos celulares responsables de la construcción de la marca mnésica, se sabe hoy que la capacidad de una neurona de detectar y efectuar un cambio específico en base a un patrón de estimulación reside en la activación coordinada de las vías de transducción involucradas y la resultante de la interacción entre estas, traducido como un patrón espacial y temporal específico de activación de quinasas.

Por este mecanismo las señales químicas de las que se ha hecho mención inicialmente, neurotransmisores y neuromoduladores, mas allá de sus efectos rápidos producto de la interacción con receptores ionotrópicos, pueden provocar cambios estables en la eficacia sináptica modificando las propiedades funcionales de elementos sinápticos y a largo término

promoviendo la expresión de genes involucrados en la estabilización de los cambios.

Resumiendo, específicamente en los procesos de la plasticidad sináptica que subyacen la formación de memoria, se ha demostrado que diversas vías de transducción a través del efecto de las respectivas proteínas quinasas participan como:

- a. detectores de patrones específicos de estimulación: por ejemplo como detectores de coincidencias, que específicamente se activan y transfieren ante la ocurrencia coordinada de dos señales, o como detectores de patrones temporales específicos de estimulación
- b. amplificadores y distribuidores de información a nivel celular y subcelular de acuerdo con su localización intracelular y la de sus substratos; por ejemplo, como localizadores de los efectos en sitios de liberación sináptica o en el núcleo por traslocación una vez activos, para la activación específica de factores de transcripción
- c. sistemas capaces de retener información; persisten activados luego de que la estimulación que lo indujo ha cesado

## **1.4 El proceso de formación de memoria**

Habiendo fundamentado el estudio del papel de las vías de transducción de señales en procesos de memoria, e introducido de manera general el funcionamiento de las mismas, a continuación se explicará con mas detalle la secuencia de eventos que conforman la formación de una memoria para luego entrar directamente en el tema de la participación específica de mecanismos de transducción.

### **1.4.1 Fases de la memoria**

Las memorias pueden durar desde segundos a días o una vida entera dependiendo de la relevancia de la información que codifican y de la fuerza de la experiencia que les dio origen. Así, una experiencia que será recordada por

un tiempo largo, desencadena una secuencia de fases transientes y estables de memoria que cubren desde el momento inmediato a la adquisición y etapas intermedias hasta finalmente memorias estables o de largo término (Menzel, 1999). La existencia de al menos dos y tres fases de memoria con dinámicas temporales propias ha sido comprobada para distintas especies como ser la abeja *Apis mellifera* (Hammer & Menzel, 1995a), *Drosophila* (De Zazzo & Tully, 1995), cangrejo *Chasmagnathus* (Maldonado et al., 1997), *Aplysia* (Carew et al., 1972; Byrne, 1987), ratas (McGaugh, 1966), primates (Goldman-Rakic, 1992) y humanos (Atkinson & Shrifin, 1968).

Sobre la base del análisis mecanístico, farmacológico, y de los requerimientos de inducción y de expresión, se han diferenciado tres fases de la memoria que resultan de interés desde el punto de vista neurobiológico. Estas tres fases definidas en base a su duración son la **memoria de corto término** (MCT), que se refiere a los sistemas que retienen la información desde el momento de la experiencia y temporalmente, mientras la información es transferida a formas más estables de almacenamiento como la **memoria intermedia** (MI) o a una forma de memoria potencialmente permanente como la **memoria de largo término** (MLT) (Squire 1987; Sedman et al, 1991; Hammer, 1995).

La expresión secuencial de estas tres fases de memoria, sugiere un procesamiento de tipo serial, en el cual cada una de estas fases es dependiente de la anterior. Sin embargo, se ha demostrado que las fases también pueden ser inducidas y procesadas en paralelo desde el momento del aprendizaje. El tipo de procesamiento serial o paralelo ha mostrado depender de la especie, del paradigma y de las fases de memoria en cuestión. En el modelo de *Aplysia* se ha estudiado en detalle el fenómeno de sensibilización de una respuesta defensiva y los mecanismos celulares que subyacen la retención de este aprendizaje a corto, mediano y largo término. Se ha comprobado con respecto al procesamiento de estas tres fases de memoria que la memoria de largo término es dependiente de la existencia de una memoria intermedia. Sin embargo el procesamiento de estas es independiente o paralelo a la memoria de corto término (Sutton et al, 2001). En pollos que aprenden a asociar un estímulo a un refuerzo negativo se ha determinado un

procesamiento serial de la memoria de corto y de largo término (Gibbs & Ng, 1977). En ratas la existencia de las distintas fases de memoria es independiente y son paralelamente inducidas por el aprendizaje (Frieder & Allewis, 1978; Izquierdo et al., 1998).

### **1.4.2 Etapas en el proceso de formación de memoria**

El estudio de los mecanismos involucrados en la formación de memorias muestra la limitación indefectible de que las memorias son accesibles solo a través de la evocación. Esto provoca que en muchas situaciones experimentales en las que se utilizan metodologías o intervenciones irreversibles para determinar el papel de un mecanismo celular o una estructura nerviosa en la memoria, no se pueda determinar que nivel del procesamiento o estadio en la formación de una memoria está siendo afectada (Dubnau et al., 2001; Menzel & Müller; 2001).

Del estudio sobre todo de pacientes neurológicos amnésicos, se ha determinado que la memoria esta conformada por la existencia de al menos cuatro procesos distintos y relacionados de manera serial. El correcto funcionamiento de estos cuatro procesos brinda la capacidad de retener la información y utilizarla un tiempo después. Por el contrario con uno solo de estos procesos que falle el síntoma es la amnesia.

**Adquisición:** se refiere al proceso inicial en el cual la información provista por la experiencia es recibida e interpretada. Durante esta etapa se establecen el significado, las asociaciones propias de la experiencia y la asociación con información previa. Resulta determinante el estado de motivación para que la experiencia sea adquirida. Un buen indicador de que un aprendizaje fue adquirido es la expresión de una buena memoria de corto término. Sin embargo, la ausencia de la memoria de corto término no siempre indica que no haya habido adquisición.

**Consolidación:** se refiere a la conversión de la información recientemente adquirida a una forma estable y duradera de almacenamiento. Este punto será desarrollado en detalle mas adelante.

**Almacenamiento:** Se refiere a los mecanismos y sitios en los cuales la memoria es retenida en el tiempo. Este proceso no implica cambios sino el mantenimiento de la marca mnésica dejada por la consolidación. Una propiedad extraordinaria de almacenamiento de largo término es su capacidad ilimitada en contraste con la memoria de corto término la cual es muy limitada.

**Evocación:** Son los procesos que permiten recuperar y utilizar la información almacenada. La evocación involucra recuperar la información de elementos almacenados en distintos sitios y reconstruirlos de acuerdo a la experiencia.

La información ya almacenada es luego objeto de modificación por el proceso de **extinción**. Este proceso se evidencia como la pérdida de la respuesta aprendida, cuando el animal verifica que la relación entre estímulos inicialmente aprendida ya no existe. Por lo tanto la extinción no debe ser confundida o tomada como olvido de la respuesta sino como un nuevo proceso de aprendizaje.

### 1.4.3 Modulación de la memoria

Los procesos de memoria pueden ser afectados positiva o negativamente durante las fases de adquisición, consolidación o evocación por diversos factores endógenos consecuentes de estados internos del animal, tales como estados de alerta, estrés, períodos reproductivos, etc. (McGaugh, 1983). La existencia de estos mecanismos moduladores de los procesos cognitivos ha sido revelada tanto en vertebrados (Squire, 1987) como en invertebrados (Krasne, 1978). Esto ha llevado de manera teórica a dividir los procesos participantes en la construcción de la marca mnésica entre sistemas neuronales *intrínsecos* y *extrínsecos*. El **sistema intrínseco** se refiere a los elementos celulares y circuitales directamente involucrados en la representación de la marca mnésica, en la construcción de ella y en la evocación. El segundo sistema, referido como **sistema extrínseco**, comprende mecanismos capaces de modular positiva y negativamente la capacidad del sistema intrínseco. El *sistema extrínseco* consiste en vías que influyen la construcción de los trazos mnésicos mediante la liberación de neurotransmisores, neuromoduladores, etc.

La existencia de un sistema modulador de la memoria, ha sido justificada en términos de la conveniencia adaptativa de regular que eventos sean o no sean aprendidos o recordados según determinadas circunstancias (Gold & McGaugh, 1977). Tal es el caso comprobado para el papel de las Angiotensinas endógenas y el modelo de memoria que fue utilizado en la realización de esta tesis, el cangrejo *Chasmagnathus*. Delorenzi y colaboradores (1999), demostraron que las angiotensinas endógenas liberadas en situaciones de estrés hídrico poseen un efecto modulador positivo sobre la consolidación de una memoria de largo término.

El acercamiento farmacológico al estudio de la memoria, suele presentar limitaciones para definir los mecanismos que son parte del *sistema intrínseco* y *extrínseco* en la formación de memorias. El efecto facilitador o amnésico de drogas puede en muchos casos ser explicado en términos de intervenir en un sistema o en otro.

#### **1.4.4 Consolidación de la memoria**

La presente tesis pone énfasis en los mecanismos y secuencia de eventos celulares que ocurren como parte del proceso de consolidación de la memoria. Por este motivo es de especial interés definir y profundizar el significado e importancia de este proceso:

La consolidación se refiere al proceso que convierte a la información recientemente adquirida y almacenada en forma lábil a una forma de almacenamiento robusta y de larga duración.

Las primeras evidencias experimentales que revelaron la existencia de un período de consolidación provienen de aprendizaje verbal en humanos (Müller & Pilzecker, 1900; en McGaugh, 1999). En estos trabajos, un grupo de personas debía aprender una lista de palabras y 24 horas después se evaluaba su capacidad para recordarlas. Cuando inmediatamente después de aprender la lista, las personas debían hacer lo mismo con una segunda, no lograban recordar la primera lista en la prueba de retención. Sin embargo, cuando el momento de aprender la segunda lista se separaba por más de 2 o 3

horas de la primera, entonces sí lograban recordarla. Estos resultados pusieron en evidencia que existe un periodo de labilidad inmediatamente después de la experiencia durante el cual la memoria es sensible a la disrupción y que una vez superado este periodo, la memoria se hace resistente a la disrupción.

La existencia de este proceso de consolidación, recibió luego el apoyo observaciones clínicas de casos de amnesia retrograda observada después de traumas o convulsiones epilépticas, en los que la amnesia observada se limitaba a los eventos ocurridos dentro de las 2 horas previas al hecho (Zubin & Barrera, 1941; Russel & Nathan, 1946; Russel, 1971) y casos de amnesia anterógrada de pacientes neurológicos que tenían memoria de corto plazo normal, pero la incapacidad de formar memorias de largo plazo, por lo que no podían retener lo aprendido por mas de pocos minutos o después de breves distracciones (Scoville & Milner, 1957; Corkin, 1984).

Las observaciones clínicas fueron luego también comprobadas en condiciones experimentales con animales de laboratorio (Duncan, 1949). Ratas que aprendían una tarea y cuya retención era evaluada 24 horas después del entrenamiento mostraban amnesia cuando dentro de las dos horas posteriores al entrenamiento eran sometidas a electrochoque convulsivo. Sin embargo, el mismo tratamiento no afectaba la capacidad de evocar lo aprendido cuando el electrochoque se realizaba mas de 2 o 3 horas después del entrenamiento.

El conjunto de estas evidencias clínicas y experimentales sugirió que el periodo de consolidación consiste en la construcción de una memoria estable que se evidencia cuando decae la expresión de las memorias cortas. La consolidación de la memoria de largo término involucra mecanismos que no son de instalación inmediata, relacionados con los cambios morfológicos que ya habían sido largamente postulados.

Esto encontró apoyo cuando el proceso de consolidación de la memoria fue por primera vez llevado a nivel bioquímico y se descubrió que la memoria de largo término y no la de corto término es dependiente de la síntesis proteica durante el periodo de consolidación (Flexner et al., 1983; Agranoff, 1972; Barondes, 1975; Davis & Squire, 1984; Catellucci et al, 1989; Crow &

Forrester, 1990). Estos resultados indicaron por primera vez que la consolidación es un periodo crítico durante el cual nuevas proteínas deben ser sintetizadas (Goelet et al., 1986).

#### **1.4.5 El estudio de la consolidación a nivel celular**

El avance de la bioquímica y de la biología molecular en los últimos 30 años ha permitido identificar el papel de diversas vías de transducción de señales y de la expresión génica durante el proceso de consolidación. Mediante estrategias intervencionales y de correlación se ha identificado y ubicado espacial y temporalmente la participación de diversas vías de señalización intracelular en la construcción de la representación neuronal de las memorias para diversos modelos.

Se ha determinado que la participación de distintas vías de señalización durante el proceso de consolidación es variable dependiendo de la experiencia y del modelo. Distintas vías de transducción participan diferencialmente durante distintas etapas o periodos de la consolidación y se ha demostrado que algunas de ellas participan en etapas tempranas y tardías del proceso (Freeman et al., 1995; Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Merlo et al., 2001).

El hecho de que la memoria de largo término una vez consolidada es inalterable, hoy en día vuelve a ser discutido, ya que se ha observado que los eventos de evocación vuelven a colocar a las memorias en un estado de labilidad (Nader et al., 2000; Sara, 2000; Pedreira et al., 2002). Esta observación sugiere que cada vez que una memoria es evocada, debe ser nuevamente consolidada y que dicho proceso de re-consolidación es dependiente de los mismos mecanismos celulares y vías de transducción que tomaron parte en la consolidación primaria.

A continuación, se hará una breve reseña de las principales vías de transducción y proteínas quinasas cuya participación ha sido demostrada en procesos de plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria

#### 1.4.5.1 Vía de la PKC y memoria

La proteína quinasa C (PKC) se activa por interacción con diacil-glicerol (DAG), un segundo mensajero hidrofóbico que se produce en la cara interna de la membrana plasmática por acción de la enzima fosfolipasa C luego de la activación de receptores metabotrópicos específicos. Al menos doce isoformas de PKC han sido identificadas en mamíferos y todas ellas se expresan en tejidos nerviosos con mayor presencia en las estructuras cerebrales clásicamente vinculadas con procesos de memoria. Entre estas isoformas existen dos categorías en base a su dependencia de  $Ca^{2+}$ . Se ha descrito que la activación prolongada de PKC sumado a altos niveles de  $Ca^{2+}$  conduce a una activación persistente de la enzima por proteólisis del dominio regulatorio (Klann et al., 1991; Sacktor et al., 1993). De acuerdo con esta característica se ha observado en hipocampo de mamíferos que el aprendizaje induce la activación y traslocación persistente de la enzima a la fracción de membrana, lo que sugiere un posible papel de PKC en el mantenimiento de un proceso de plasticidad de largo término vinculado a la modulación de canales (Van der Zee et al., 1992; Golski et al., 1995; Bernabeu et al., 1995). De acuerdo con esta posibilidad, se ha demostrado que la inhibición de PKC afecta la formación de la memoria de largo término sin comprometer la adquisición (Burchuladze et al., 1990; Zhao et al., 1994).

Los estudios a nivel de plasticidad neuronal en hipocampo de mamíferos han mostrado que la activación de PKC es fundamental para la inducción y la expresión de la potenciación de largo término (Colley et al., 1989; Roberson et al., 1996).

A pesar de estos antecedentes, en un análisis crítico, Micheau y Riedel (1999) explican que aun no se ha podido determinar exactamente la contribución de PKC en el proceso de consolidación ya que PKC parecería activarse inespecíficamente ante una diversidad de situaciones comportamentales y su activación no ha podido ser involucrada con la formación de un tipo de memoria en particular (Micheau & Riedel, 1999). Una limitación al respecto, ha sido la imposibilidad de separar los efectos diferenciales que cumplen las 12 isoformas de PKC hasta ahora identificadas. Debería considerarse la

especificidad funcional que las isoformas brindan de acuerdo con su localización subcelular y asociación con substratos particulares (Liu, 1996; Tanaka & Nishizuka, 1994). Por ejemplo solo la isoforma  $\gamma$  de PKC parecería estar involucrada en la formación de una memoria espacial (Van der Zee et al., 1997).

En invertebrados el papel de PKC a sido básicamente comprobado a nivel de plasticidad sináptica en *Aplysia* (Braha et al., 1990), *Hermisenda* (Farley & Schuman, 1991) y solo probado en memoria en *Apis mellifera* (Grünenbaum & Müller, 1998). En este modelo se ha probado que existe una activación persistente de PKC inducida por el aprendizaje, y que dicha activación está vinculada a la formación de una fase tardía de memoria.

#### 1.4.5.2 Vía de las CaM Quinasas y memoria

Como se ha mencionado previamente, una característica de los mecanismos capaces de retener información debe ser la posibilidad de adoptar estados que perduren cuando la estimulación que los indujo ha cesado. Esto se repite también a nivel de los mecanismos que participan en la inducción y construcción de la marca mnésica, ya que dicho proceso puede durar minutos y la experiencia que los indujo puede durar tan solo segundos. Una de las principales señales que inicia el procesamiento intracelular es la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas que, dependiendo de su concentración, activa quinasas o fosfatasa (Malenka, 1994; Teyler et al., 1994). Para que esta activación tenga efecto en la inducción de cambios estables debe durar minutos o a veces horas, lo que constituye mucho más tiempo que lo que dura el aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . En otras palabras, la actividad de quinasas o fosfatasa debe volverse independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  o de la señal que las activa. Este es el caso de la calcio-calmodulina quinasa II (CaM-KII), cuya activación es dependiente de calcio, pero una vez activa sufre un cambio conformacional y una autofosforilación por la cual queda en un estado catalítico independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lisman, 1994).

Experimentos interventivos y de correlación han determinado en vertebrados que inmediatamente después de experiencias que inducen la formación de memoria de largo término hay una activación de CaMKII en hipocampo y amígdala que es fundamental en una etapa temprana del proceso de consolidación (Wolfman et al., 1994; Cammarota et al, 1998; Tan & Liang, 1997). A nivel de plasticidad sináptica en hipocampo, se ha determinado que CaMKII regula positivamente por fosforilación la corriente a través de los receptores de glutamato de tipo AMPA, lo que constituye uno de los factores responsables de la expresión de la potenciación sináptica en hipocampo (Lisman, 1994).

Experimentos en *Drosophila* han provisto de evidencias independientes a favor de un papel fundamental de CaMKII en la formación de memoria. La expresión condicional de un inhibidor de CaMKII en animales transgénicos resulta amnésica en la formación de una memoria relacionada con conductas de apareamiento (Griffith et al, 1993).

#### **1.4.5.3 Vía de la MAPK y memoria**

La proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), inicialmente vinculada con procesos de proliferación y diferenciación celular (Graves et al., 1995), no es una quinasa de transducción característica por el hecho de que no es directamente regulada por segundos mensajeros, sino que es regulada por fosforilación como evento final de una cascada de quinasas (Sweatt, 2001).

El interés por el estudio de MAPK en procesos de plasticidad y memoria proviene de los mecanismos que regulan su activación y de sus substratos. MAPK ha sido considerada en neuronas como un punto de integración de señales (Sweatt, 2001). Su activación en hipocampo ocurre ante una variedad de señales extracelulares como ser factores tróficos (Gottschalk et al., 1998), activación por receptores NMDA, receptores  $\beta$ -adrenérgicos y receptores muscarínicos, mediados por PKC, PKA e incluso por mecanismos dependiente de AMPc independiente de PKA (Roberson et al., 1999; de Rooij et al., 1998). MAPK activa promueve la activación del factor de transcripción CREB en

hipocampo de rata (Lu et al., 1999) y se ha probado que MAPK directamente fosforila el factor ELK-1 en cortex insular durante la formación de condicionamiento aversivo (Berman et al., 1998).

Las primeras evidencias que prueban directamente un papel de MAPK con procesos de plasticidad provienen de experimentos realizados en *Aplysia*. Kandel y col. probaron que la activación y traslocación de MAPK al núcleo y la activación de factores de transcripción es fundamental para la facilitación sináptica que subyace la sensibilización de largo término (Martin et al., 1997; Michael et al., 1998). La activación de MAPK también interviene en la fosforilación e internalización de moléculas de adhesión celular (CAM) en las sinapsis, paso fundamental para la instalación de cambios de largo término (Bailey et al., 1997). La activación de MAPK también ha sido reportada en el invertebrado *Hermissenda* después de un protocolo de entrenamiento (Crow et al., 1998).

En mamíferos se ha comprobado la activación de MAPKs luego de la inducción de la potenciación de largo término en area CA1 de hipocampo (English & Sweatt, 1996) y luego de las experiencias aversivas (Alonso et al., 2002). El papel de MAPKs en memoria en mamíferos ha sido probado farmacológicamente. La inhibición de la cascada de activación de MAPK impide la formación de memorias asociativas de largo término dependientes de hipocampo, amígdala y cortex insular (Alonso et al., 2002; Atkins et al., 1998; Berman et al., 1998; Selcher et al., 1999).

#### **1.4.5.4 Tirosina-quinasa y memoria**

Las proteínas tirosina quinasa (PTK), denominadas así por fosforilar residuos de tirosina, pueden ser esencialmente divididas en dos familias, las que constituyen receptores de membrana con dominios citoplasmáticos de actividad quinasa, y las tirosina quinasa citoplasmáticas no asociadas a receptores (Boxall & Lancaster, 1998). Las primeras han sido inicialmente caracterizadas como receptores de factores tróficos tales como el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro

(BDNF), cuyo efecto ha sido determinado en procesos de plasticidad sináptica en hipocampo y luego comprobado para la formación de memoria de corto y largo término en ratones y en ratas (Linnarsson et al., 1997; Alonso et al., 2002).

Las tirosina quinasas no receptores se activan por fosforilación producto del aumento intracelular de  $Ca^{2+}$ . Entre sus substratos se encuentran receptores nicotínico, NMDA, GABA y AMPA. En vertebrados se ha determinado farmacológicamente el papel fundamental de la tirosina quinasa, *src*, para la fase tardía de la potenciación en hipocampo (Lu et al., 1998; O'Dell et al., 1991) como en la formación de una memoria de largo término (Rosenblum et al., 1995). Animales deficientes del gen *fyn*, que codifica para una tirosina quinasa no receptor, también muestran deficiencias en la fase tardía de LTP y en aprendizajes de tipo espacial (Grant et al., 1992).

En invertebrados el papel de una tirosina quinasa en memoria fue probado en la mutante de *Drosophila*, *linotte*. Deficiencias en este gen muestran una reducción de un 60% en la retención de una tarea de discriminación de olor que se evidencia recién 30 minutos después de la adquisición (Dura et al., 1995). Esto demuestra un papel en la consolidación o en la expresión tardía de la memoria.

Resumiendo, las evidencias sugieren que los receptores tirosina quinasa están involucrados durante la adquisición de un aprendizaje y la memoria de corto término, mientras la activación de tirosinas quinasas no receptores participa en la conversión a memorias de largo término.

## 1.5 Vía del AMPc y PKA

Dado que el interés central de esta tesis reside en el papel de la vía de transducción del adenosina- 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc) en la formación de una memoria de largo término, las generalidades respecto de su funcionamiento y regulación serán explicadas en mayor detalle que las vías mencionadas anteriormente. Por el mismo motivo, los conocimientos e interrogantes relacionados con su participación en plasticidad neuronal y

comportamental serán presentados en esta sección y luego profundizados en relación con los objetivos y resultados de cada capítulo de esta tesis.

La vía de transducción del AMPc es probablemente una de las más estudiadas y que ha influenciado el estudio de otras vías de segundos mensajeros. Esta se basa en el uso de un factor intracelular hidrosoluble, el **AMPc**, que se produce por activación de la enzima **adenilato ciclasa** en respuesta a estimulación por hormonas o neurotransmisores. AMPc difunde en el citoplasma de la célula donde ejerce su efecto mayoritariamente a través de la activación de la **proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)**.

La participación de la vía de transducción del AMPc en procesos de aprendizaje, memoria y plasticidad neuronal ha sido demostrada inicialmente desde los estudios realizados por Kandel y colaboradores en el molusco marino *Aplysia* (Kandel & Schwartz, 1982). Desde entonces el papel de esta vía ha sido descrito en diferentes modelos a nivel comportamental y de plasticidad sináptica, aunque en casos con diferencias en cuanto a su participación en el desarrollo de procesos de corto, mediano y largo término.

La importancia y el papel crítico de esta vía de transducción en los procesos de plasticidad reside en que no es un simple mecanismo de transferencia de información lineal del exterior de la célula al citoplasma, sino también un sistema capaz de detectar configuraciones de estimulación y de retenerla por segundos o minutos (Buxbaum & Dudai, 1989).

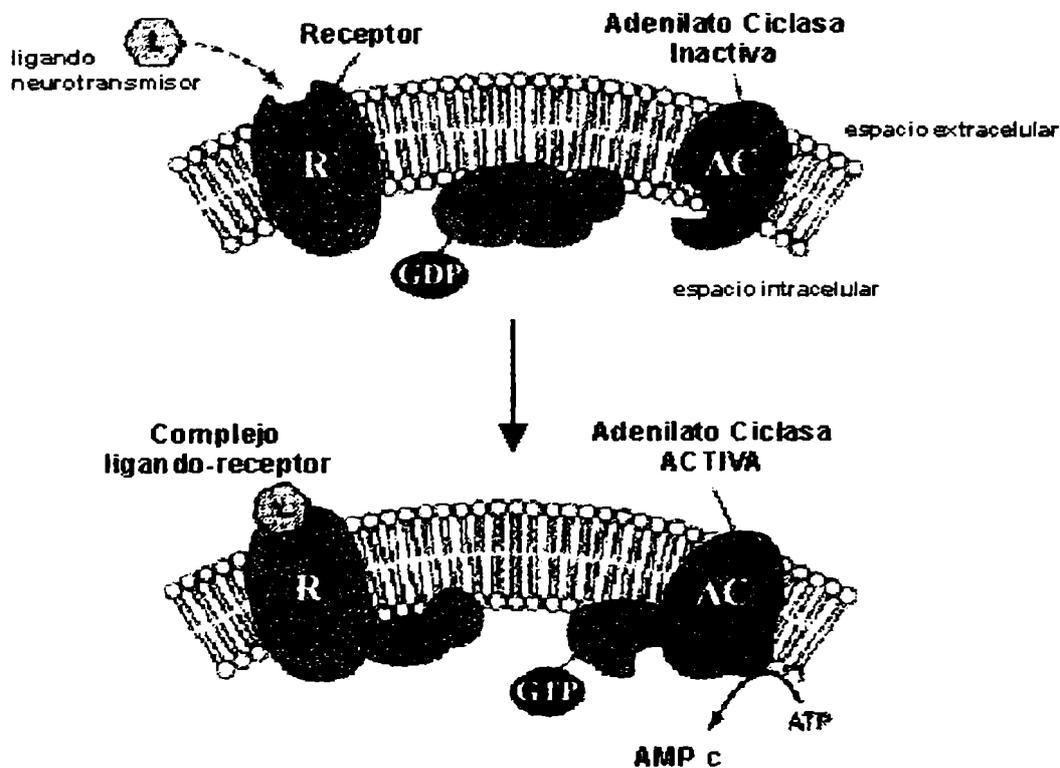
Hoy en día la importancia de esta vía se resalta desde el primer paso en la cascada de transducción: la activación de la adenilato ciclasa.

## **1.5.1 Adenilato ciclasa**

### **1.5.1.1 Activación por neurotransmisores**

El esquema básico de activación de esta vía de transducción comienza con el pegado de un ligando o neurotransmisor específico a un receptor de tipo metabotrópico ubicado en la membrana plasmática. La formación del complejo ligando-receptor provoca un cambio en el dominio citoplasmático del receptor

que permite interaccionar con una proteína denominada Gs que se activa por pegado de una molécula de guanosina trifosfato (GTP). Gs en su estado activo forma un complejo con la proteína integral de membrana, **adenilato ciclasa (AC)**, que cataliza la conversión de adenosina trifosfato (ATP) en AMPc. En su unión con AC, Gs actúa también como GTPasa, hidrolizando el GTP unido, lo que induce la separación del complejo activo deteniendo la síntesis de AMPc. De esta manera, la duración de la producción de AMPc está regulada por la actividad GTPasa de Gs. Si el transmisor o ligando continua pegado al receptor entonces este vuelve a activar a Gs y el ciclo comienza nuevamente (Gilman, 1995; Hamm & Gilchrist, 1996).



**Figura 1.1: Activación de Adenilato Ciclasa.** El pegado del ligando al receptor de membrana permite la interacción con la proteína Gs. En su estado inactivo Gs se encuentra conformada por tres subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La interacción con el receptor permite el cambio de una molécula de GDP por una de GTP en la subunidad  $\alpha$  y la disociación de las subunidades regulatorias  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  libre activa la adenilato ciclasa.

El complejo ligando-receptor puede interactuar sucesivamente con muchas proteínas Gs que exceden en número a los receptores, lo que constituye el primer paso de amplificación de esta vía. De este modo una baja actividad sináptica debida a un numero relativamente pequeño de neurotransmisores puede ser convertido a un numero mayor de complejos de ciclasa activos suficiente para inducir en la célula una concentración efectiva del AMPc.

En diversos tipos neuronales y en distintos animales se han identificado receptores específicos que activan AC vía Gs, receptores tipo D<sub>1</sub> de dopamina, β<sub>1</sub> y β<sub>2</sub> -adrenérgicos, receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>4</sub>, receptores de octopamina, receptores H<sub>2</sub> de histamina, I<sub>2</sub> y E<sub>2</sub> de prostaglandinas entre otros (Schramm & Selinger, 1984; Lauder, 1993).

La regulación de AC también puede ser negativa ya que existen complejos ligando-receptor que activan una proteína Gi que contrarresta la acción de Gs. Por este mecanismo, aminas α-adrenérgicas, serotonina a través de receptores de tipo 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> y dopamina por receptores D<sub>2</sub> pueden bajar los niveles de AMPc en la célula (Antoni, 2000).

#### **1.5.1.2 Modulación de AC por Ca<sup>2+</sup>**

El proceso explicado anteriormente, constituye el mecanismo básico de activación de AC, sin embargo una característica que resulta particularmente importante en sistema nervioso es la posibilidad de múltiples formas de regulación en la producción de AMPc como propiedad emergente de la existencia de distintas isoformas de adenilato ciclasa. Al menos diez isoformas de AC han sido reportadas por ejemplo en mamíferos, nueve de las cuales se expresan en sistema nervioso. La activación de AC2, AC3 y AC5 es modulada por Ca<sup>2+</sup> vía PKC (Choi et al., 1993; Jacobowitz et al., 1993). AC2 y AC4 son isoformas insensibles al Ca<sup>2+</sup> (Tang & Gilman, 1991; Gereau & Conn, 1994) mientras AC1 y AC8 son positivamente moduladas por Ca<sup>2+</sup> vía interacción con Calmodulina (CaM). La combinación entre las propiedades de activación y la modulación por Ca<sup>2+</sup> hace que cada isoforma tenga características particulares de activación (Cooper et al., 1995; Chern, 2000).

### 1.5.2 Adenilato Ciclasa en aprendizaje y memoria

En el molusco marino *Aplysia*, uno de los modelos probablemente mejor descritos desde el punto de vista de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen el aprendizaje y memoria, se ha comprobado que AC no es un mero mediador en la transferencia de información entre el neurotransmisor y la señal intracelular, sino que juega un papel fundamental y decisivo en los mecanismos transduccionales que regulan el fenómeno la facilitación sináptica que subyace el condicionamiento de una respuesta defensiva. En este paradigma de aprendizaje un estímulo táctil es asociado a un estímulo aversivo que provoca la contracción de las branquias (Carew et al., 1981). A nivel celular, el estímulo condicionado, induce la despolarización y consecuente entrada de  $Ca^{2+}$  en la terminal presináptica de la neurona sensorial. El estímulo negativo o incondicionado, mediado por una interneurona moduladora hace una sinapsis serotoninérgica con la misma terminal. Serotonina activa receptores metabotrópicos que activan AC en la terminal presináptica de la neurona sensorial (Hawkins et al., 1983). AC activada vía Gs por el estímulo incondicionado y vía  $Ca^{2+}/CaM$  por el estímulo condicionado, constituye el sitio de convergencia de los dos estímulos y el efecto sinérgico de los dos estímulos sobre AC inicia la cascada de eventos que conduce a la facilitación sináptica. En preparaciones de membrana de neuronas de *Aplysia*, se ha demostrado además que la máxima activación de AC se obtiene cuando el  $Ca^{2+}$  precede a la activación por serotonina, lo que equivale a la situación comportamental del estímulo condicionando precediendo al incondicionado (Abrams et al., 1998). Una capacidad similar de AC de detectar el orden temporal de los estímulos ha sido también demostrada en cerebelo de mamíferos (Allison et al., 1998). Estas observaciones demuestran que AC no solo es capaz de detectar la coincidencia de los estímulos sino también el orden de los mismos y el valor predictivo del estímulo condicionado.

El papel de AC en aprendizaje y memoria se ha extendido también a otros modelos y paradigmas de memoria. En *Drosophila* se han identificado las mutantes, *amnesiac* (Feany & Quinn, 1995) y *rutabaga* (Livingstone et al.,

1984) con deficiencias en aprendizaje y memoria que muestran reducida la actividad de AC. En particular el gen *rutabaga* codifica para una AC dependiente de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina.

También en vertebrados se ha probado un papel fundamental de AC en aprendizaje asociativo. En ratas, la activación de AC en hipocampo mediante administración de forskolina después de un aprendizaje asociativo posee efecto facilitador. Correlativamente se ha observado también que la ocurrencia de los estímulos en formas asociada, y no los estímulos por separado, inducen aumento en el nivel de AMPc en hipocampo en un aprendizaje de evitación pasiva, lo que revela la activación de AC específicamente después de una experiencia asociativa (Bernabeu et al., 1997).

En ratones se ha comprobado que diferentes formas de aprendizaje (espacial y de procedimiento) inducen patrones específicos de activación de distintas isoformas de AC. Eso sugiere que la formación de distintas memorias involucra procesamientos bioquímicos distintos desde la activación de distintas AC (Guillou et al., 1998; 1999). El diseño de ratones "knock-out" ha brindado la posibilidad de evaluar la participación de isoformas específicas en el aprendizaje, memoria y en los fenómenos de plasticidad sináptica en hipocampo. Estos experimentos han revelado que las isoformas AC1 y AC8, que son moduladas positivamente por  $Ca^{2+}$ /calmodulina, son indispensables para la potenciación de largo término en hipocampo y también lo son para la formación de memorias dependientes de hipocampo tales como una tarea de evitación pasiva y una tarea espacial. Por el contrario un condicionamiento de claves, independiente de hipocampo, no es afectado (Wong et al., 1999).

### **1.5.3 La actividad de AC como punto de relevo o de decisión**

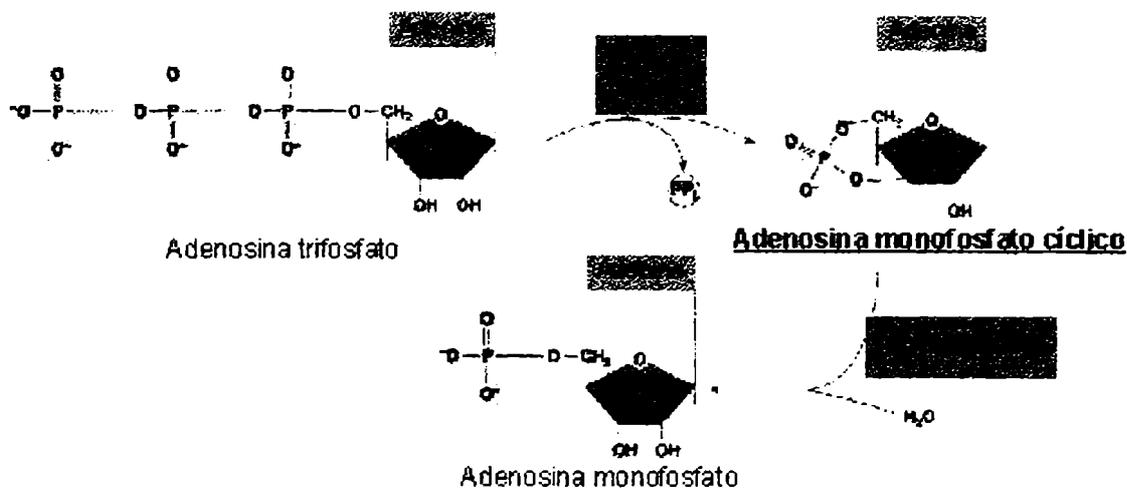
En las primeras secciones de esta tesis se ha presentado el interés de la neurobiología en identificar y comprender los mecanismos celulares involucrados en el procesamiento de la información contenida en los estímulos que conforman una experiencia y en el control de los cambios sinápticos que dicha experiencia induce. Las proteínas de transducción con regulación dual,

tales como la AC dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina han sido sugeridas como sitios de convergencia de los estímulos en aprendizajes de tipo asociativo, donde la presentación asociada de los estímulos muestra activación sinérgica de la enzima. Los ejemplos anteriores han sido especialmente considerados por ser casos en los que la activación de AC cumple entonces un papel activo en la regulación del proceso de formación de memoria. Sin embargo, en otros paradigmas se ha encontrado que la activación de AC es igualmente necesaria aunque mas no sea que como parte de la transferencia de la estimulación inducida por un neurotransmisor.

Por otro lado, se ha comprobado que la existencia de isoformas de AC con características propias de activación y de distribución subcelular, contribuyen a la especificidad de los procesos bioquímicos que subyacen distintos sistemas de memoria.

### 1.5.4 AMP cíclico

Como ha sido explicado anteriormente, adenilato ciclasa activa produce AMPc que difunde como segundo mensajero en el citoplasma de la célula. El AMPc en el citoplasma es una molécula estable excepto que sea degradada por la enzima fosfodiesterasa (PDE), la cual rompe el enlace cíclico inactivando así la molécula. Existen diversas isoformas de PDE con mecanismo propios de regulación. De esta manera, la concentración de AMPc en la célula es el resultado entre la síntesis por activación de AC y la degradación por PDE.



**Figura 1.2: Síntesis y Degradación de AMP cíclico**

### 1.5.5 AMP cíclico, aprendizaje y memoria

Al explicar los mecanismos responsables de la concentración de AMPc en la célula y las evidencias que revelan la participación de AC en procesos de memoria, me he basado en el orden en que suceden los eventos desde la llegada de una señal extracelular. Sin embargo haciéndolo de ese modo me he adelantado en el orden cronológico de los hallazgos.

Previo al conocimiento de la vía del AMPc tal como la cascada de eventos que se conoce ahora, tan solo existían pruebas, gracias a las investigaciones de Sutherland sobre el metabolismo de la glucosa, de que la molécula de AMPc se comportaba como un segundo mensajero responsable de la acción intracelular de hormonas con receptores en membrana. En ese momento del desarrollo de la bioquímica, Kandel, Schwartz y colaboradores habían identificado en *Aplysia* el fenómeno fisiológico que subyacía la sensibilización de una respuesta defensiva. El neurotransmisor responsable en dicho aprendizaje es serotonina y su acción desencadena un fenómeno de facilitación en la sinapsis sensoriomotora que a corto término resulta independiente de la síntesis proteica. Estas características del proceso y la búsqueda de una señal intracelular que mediara los efectos de la serotonina, motivaron la investigación en el área de los segundos mensajeros. Cedar y col. (1972), descubrieron que después de estimular los nervios conectivos que portan la vía del estímulo sensibilizante aumentaba el contenido de AMPc en el ganglio donde se da lugar la facilitación y que lo mismo ocurría después de la aplicación de serotonina. La función del AMPc en esta correlación quedó comprobada cuando Brunelli y col. (1976), determinaron que la aplicación de AMPc en la neurona sensorial aumentaba el fenómeno de facilitación sináptica. Las evidencias bioquímicas, farmacológicas y electrofisiológicas en la década del 70 confirmaron el papel de la serotonina a través de la vía de AMPc. Sin tener conocimiento del mecanismo de acción del AMPc, se determinó que este modificaba la conductancia en los canales iónicos de  $K^+$  prolongando los potenciales de acción en la neurona sensorial y aumentando la entrada de calcio y la liberación de neurotransmisor en la sinapsis sensoriomotora.

El papel de esta vía de transducción en memoria está altamente conservado en especies evolutivamente distantes. *Drosophila* provee de un modelo muy apto para la evaluación de los determinantes genéticos de un fenotipo. La posibilidad de criar rápida y fácilmente grandes cantidades de individuos en cautiverio y el vasto conocimiento de la genética de *Drosophila* permite correlacionar fácilmente el surgimiento de mutantes del comportamiento con deficiencias genéticas. El papel determinante de la señal de AMPc en aprendizaje y memoria es fuertemente sugerido por el fenotipo comportamental de mutantes que muestran afectadas las enzimas directamente responsables de los niveles de AMPc. La ya mencionada *rutabaga* (*rut*) posee afectada la adenilato ciclasa dependiente de  $Ca^{2+}$ . La mutante *dunce* (*dnc*), carece de la actividad de fosfodiesterasa (Byers et al., 1981); esta mutación induce niveles sobre elevados de AMPc (Devay et al., 1986), lo cual no implica un efecto facilitador de la memoria como podría intuirse, sino por el contrario, los portadores de esta mutación muestran disminuidas las capacidades de aprendizaje y memoria. Estas mutantes en su conjunto, demuestran no solo el papel del AMPc en estas funciones cognitivas, sino también la importancia de un delicado control en la regulación de la concentración de AMPc.

En el estudio de la plasticidad sináptica en hipocampo de vertebrados, la intervención de la vía del AMPc, fue sugerida inicialmente también por el hallazgo del aumento de AMPc ligado a estimulaciones que inducían potenciación (Stanton & Sarvey, 1985; Chetkovich et al., 1991). El papel del AMPc se comprobó, dado que la modulación positiva de la potenciación observada por estimulación con norepinefrina en hipocampo era mediada por receptores de tipo  $\beta$  ligados a adenilato ciclasa y que podía ser imitada por estimulación con forskolina (Stanton & Sarvey, 1985; Hopkins & Johnston, 1988).

### **1.5.6 Aceptores intracelulares de AMP cíclico**

Hasta el momento han sido identificados tres tipos de aceptores intracelulares de AMPc:

- a. la proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA constituye el receptor más relevante a través del cual AMPc ejerce la mayor parte de los efectos descritos hasta el momento (Skålhegg & Tasken, 2000);
- b. en retina, neuronas olfatorias y células del nodo sinusal del corazón se han identificado canales iónicos voltaje dependientes directamente modulados por pegado de nucleótidos cíclicos (CNGC)(Nakamura & Gold, 1987; DiFrancesco & Tortora, 1991; Pedarzani & Storm, 1995);
- c. en los últimos años se han identificado también proteínas de la familia de los GEFs (factores intercambiadores de guanina) que responden directamente a AMPc y que podrían conducir a la activación de MAPKs vía Rap-1(de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998; Bornfeldt & Krebs, 1999).

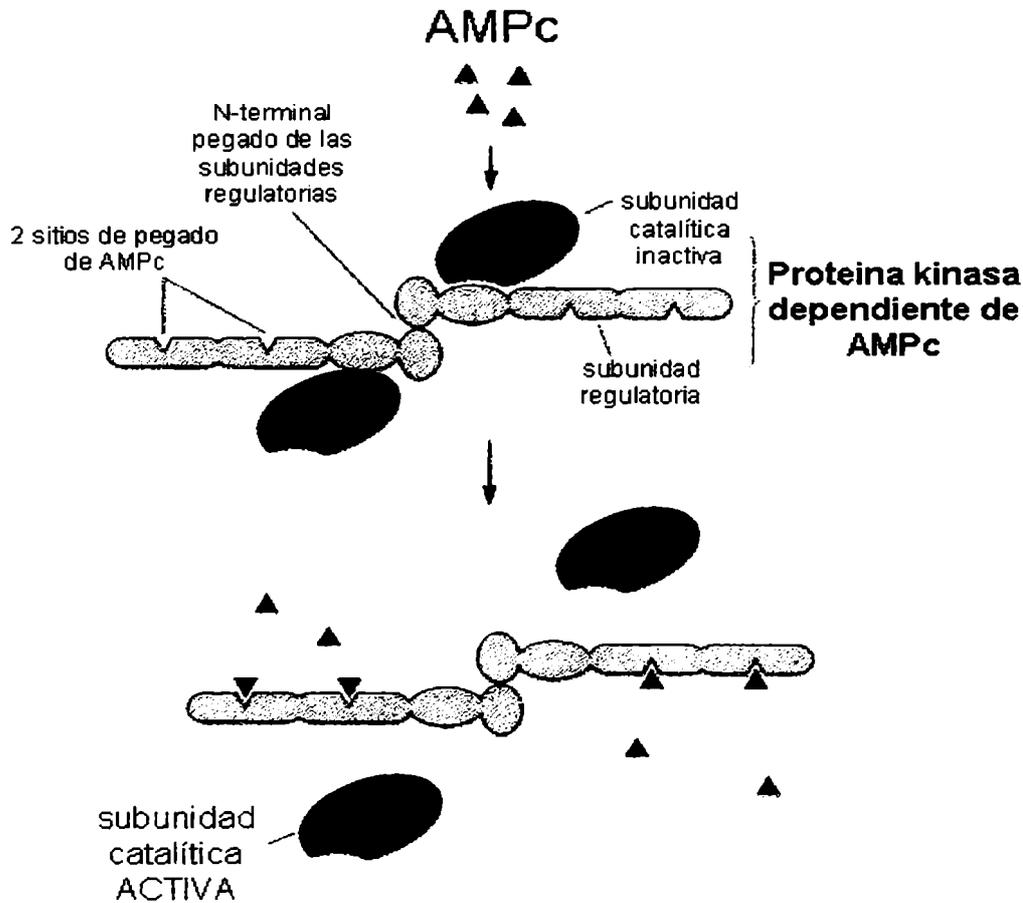
Si bien los últimos grupos de receptores de AMPc descubiertos ( b y c ) abren una nueva y atractiva posibilidad de interacción entre vías de transducción y de efectos mediados por AMPc independientes de PKA, no caben dudas acerca del papel preponderante de PKA en la mediación de los efectos de AMPc sobre una vasta cantidad de procesos fisiológicos en la mayoría de las células.

Por otro lado, para el interés de esta tesis, no se ha comprobado hasta ahora que los receptores de AMPc, b y c cumplan papel alguno en los mecanismos de memoria, mas que la posible interacción del AMPc con la vía de las MAPquinasas.

### **1.5.7 Proteína Quinasa dependiente de AMPc (PKA)**

Esta proteína quinasa, identificada y caracterizada inicialmente por Krebs y colaboradores (Walsh et al., 1968), consiste en una enzima constituida por dos subunidades catalíticas y un dímero de dos subunidades regulatorias. En ausencia de AMPc las subunidades regulatorias se unen a las catalíticas inhibiéndolas. En presencia de AMPc, cada subunidad regulatoria pega dos

moléculas de AMPc lo que induce un cambio de conformación que libera las subunidades catalíticas (Beebe & Corbin, 1986).



**Figura 1.3** Proteína Quinasa dependiente de AMPc.

Las subunidades catalíticas fosforilan serinas y treoninas dentro de un marco de aminoácidos que brindan la especificidad entre quinasa y sustrato. La secuencia de fosforilación específica de PKA consiste en dos aminoácidos básicos consecutivos, seguidos por un aminoácido cualquiera y un cuarto aminoácido sustrato, treonina o serina. Entre los sustratos de PKA en neuronas han sido identificados canales voltaje y ligando-dependientes, proteínas de las vesículas sinápticas, enzimas involucradas en la liberación de neurotransmisor y proteínas reguladoras de la expresión génica. Como consecuencia de las acciones de PKA, la vía de AMPc en neuronas, afecta las

propiedades electrofisiológicas y bioquímicas de la célula a corto y largo término.

Se ha observado para PKA una diversidad de isoformas basada en la existencia de distintos genes que codifican para subunidades regulatorias y catalíticas (Skålhegg & Tasken, 2000). La subunidad regulatoria no solo cumple el papel de inhibir la actividad quinasa brindando además características de activación propias de la isoforma (Cadd et al., 1990), sino también en muchos casos el de dirigir su acción a dominios subcelulares específicos (Scott & McCartney, 1994; Pawson & Scott, 1997). Esto se logra gracias a la existencia de determinadas isoformas de subunidad regulatoria que pueden interaccionar con diversas proteínas de anclaje ubicadas en compartimientos celulares específicos (núcleo, citoesqueleto, membrana plasmática, mitocondrias, etc,..) lo cual aumenta la especificidad y rapidez de acción de la quinasa (Skålhegg & Tasken, 2000). Las isoformas de subunidades catalíticas muestran afinidades diferenciales por distintos substratos (Panchal et al., 1994). Estas diferencias basadas en propiedades bioquímicas y funcionales, sumadas al patrón de expresión tejido específico de cada isoforma, confieren a PKA la especificidad necesaria para mediar los efectos diferenciales que la señalización por AMPc ejerce en los diversos procesos fisiológicos en los que interviene.

### **1.5.8 PKA y memoria**

Anteriormente se ha hecho mención de antecedentes en los cuales el papel de la vía del AMPc en los procesos de aprendizaje y memoria ha sido probado al nivel de AC y de AMPc. Debió esperarse hasta fines de los años 70 y principio de los 80 para conocer los mecanismos por los cuales el AMPc ejerce su acción sobre la plasticidad sináptica y memoria, y una vez mas es necesario citar como ejemplo al modelo de estudio de *Aplysia* en el cual fueron inicialmente realizados estos descubrimientos.

Para fines de los años 60, Krebs, Fischer y colaboradores, habían descubierto la PKA y su papel en la fosforilación reversible de proteínas como un

mecanismo de regulación de los procesos biológicos. Inmediatamente, Kuo y Greengard probaron la existencia de esta quinasa y del mecanismo de transducción del AMPc en una variedad de tejidos de vertebrados e invertebrados y sugirieron que todos los efectos bioquímicos y fisiológicos del AMPc eran mediados por la activación de PKA (Kuo & Greengard, 1969). Estos antecedentes y el conocimiento del efecto de AMPc sobre la permeabilidad de iones responsables de la plasticidad sináptica en *Aplysia* llevaron a inicialmente a Klein y Kandel a proponer que el aumento en AMPc inducido por la estimulación con serotonina activaba PKA, la cual por fosforilación modificaba la permeabilidad de los canales de  $K^+$  responsables de repolarizar el terminal sináptico (Klein & Kandel, 1980). Los experimentos que comprobaron esta hipótesis fueron la inyección de la subunidad catalítica purificada de PKA en la neurona sensorial y la observación de que esta manipulación reducía la corriente saliente de  $K^+$ , prolongaba la corriente entrante de  $Ca^{2+}$  y aumentaba la liberación sináptica simulando el efecto de serotonina (Castellucci et al., 1980). Posteriormente se comprobó también que la inyección de inhibidor de PKA, PKI, bloqueaba el fenómeno de facilitación presináptica inducida por serotonina (Castellucci et al., 1982). Esta última aproximación experimental permitió también observar que en las horas subsiguientes a la inducción, la expresión de la facilitación era dependiente de la actividad de PKA y que el mantenimiento de la facilitación no era producto de la fosforilación estable o irreversible de canales, sino del mantenimiento elevado de la actividad de PKA. Esta constituyó una conclusión correcta que sin embargo llevo temporalmente a la creencia errónea de que la persistencia del fenómeno de facilitación residía en el mantenimiento elevado del nivel de AMPc (Kandel & Schwartz, 1982).

Hoy en día se conoce con mas detalle el mecanismo que subyace la facilitación sináptica en *Aplysia* y el papel de la vía del AMPc. El aumento de AMPc durante la estimulación activa PKA que inicia de forma paralela procesos responsables de la memoria de corto, mediano y largo término. A corto término PKA provoca modificaciones covalentes de canales de  $Ca^{2+}$  y  $K^+$  y promueve la movilización de vesículas sinápticas a la zona activa de

liberación, todos estos mecanismos participan en la expresión de la facilitación de corto término (Dale & Kandel, 1990; Ghirardi et al., 1992; Byrne & Kandel, 1996). Paralelamente, una vez activa PKA, las subunidades catalíticas libres son traslocadas al núcleo (Bacskai et al., 1993) donde fosforilan factores de transcripción tipo CREB y promueven la expresión génica dependiente de AMPc (Kaang et al., 1993; Bartsch et al., 1995, 1998). Entre los genes de expresión temprana, se encuentra el gen *Ap-uch*, una ubiquitina hidroxilasa, que promueve la degradación de las subunidades regulatorias libres de PKA por el sistema de degradación de ubiquitina-proteosoma (Hegde et al., 1997). La degradación de subunidades regulatorias provoca la persistencia de la activación de PKA aun cuando los niveles de AMPc descienden por la inactivación de AC (Müller & Carew, 1998; Chain et al., 1999). Este mecanismo independiente de AMPc ha sido propuesto como una forma de memoria, ya que la persistencia de la actividad elevada de PKA mantiene consigo el nivel de fosforilación factores de transcripción y factores citoplasmáticos responsables de la expresión de la facilitación, aun horas después de la estimulación que lo indujo. Otros productos de expresión temprana la constituyen factores de transcripción inducibles como C/EBP (Alberini et al., 1994).

12 horas después de la inducción, la expresión de la facilitación ya es independiente de PKA, y está estabilizada por la expresión de genes efectores tardíos relacionados con los cambios estructurales y establecimiento de conexiones sinápticas responsables de la estabilización de la facilitación de largo término (Kennedy et al., 1992; Kuhl et al., 1992; Hu et al., 1993; Bailey & Chen, 1989; Bailey & Kandel, 1993).

De esta manera la activación de PKA en el modelo de facilitación presináptica de *Aplysia* interviene en la inducción y expresión de la facilitación de corto término e intermedia y solo es necesaria para la consolidación y no para la expresión de la facilitación de largo término.

En insectos el papel de PKA ha sido probado en *Drosophila* y en la abeja *Apis mellifera*. Después de las ya mencionadas mutantes de aprendizaje de *Drosophila* por control aberrante en los niveles de AMPc, *dnc* y *rut*, se

identificaron mutantes con deficiencias semejantes para aprendizaje y memoria con lesiones a nivel de PKA. *DCO* con deficiencias en la subunidad catalítica de PKA (Skoulakis et al., 1993) y *PKA-R1* con niveles reducidos de una subunidad regulatoria de PKA (Goodwin et al., 1997). Por otro lado, la caracterización bioquímica de distintas isoformas de PKA en *Drosophila*, ha provisto también de modelos en los cuales las modificaciones de la subunidad regulatoria de PKA, tales como la autofosforilación o proteólisis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , convierten la activación de PKA en un correlato bioquímico de memoria, permitiendo la activación sostenida independiente de cAMP y como producto de la convergencia con una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Buxbaum & Dudai, 1989; Aszodi et al., 1991). La memoria de largo término en *Drosophila* se ha probado también que es dependiente de la expresión génica regulada por la familia de factores de transcripción CREB (Yin et al., 1994; 1995).

El condicionamiento de la extensión de proboscis en Abeja *Apis mellifera* provee de un modelo que ha permitido un estudio detallado de los mecanismos bioquímicos involucrados en la formación de una memoria asociativa a través de estrategias moleculares, farmacológicas y de correlación. En este modelo se ha determinado la importancia de la activación de PKA para la consolidación de la memoria de largo término. Al respecto se ha determinado que la sola presencia del estímulo incondicionado provoca en el lóbulo antenal una activación de PKA de menos de diez segundos de duración (Hildebrandt & Müller, 1995). Sin embargo, si esta estimulación es precedida por el estímulo condicionado entonces la activación de PKA perdura por 40 segundos, y que tres ensayos de esta combinación, lo cual es el número necesario para inducir una memoria de largo término, provocan una activación de PKA que persiste por más de 2 minutos. La inhibición farmacológica de esta activación bloquea la formación de la memoria de largo término (Müller, 2000). La regulación negativa de PKA durante el entrenamiento mediante el uso de técnicas antisense, probó en *Apis* que la activación de PKA no afecta la adquisición sino la consolidación de la memoria, lo que se evidencia 24 hs después del tratamiento (Fiala et al., 1999).

Una participación similar de PKA es la que se ha encontrado en modelos de vertebrados para el estudio de la memoria. El fenómeno de potenciación de largo término (LTP) en hipocampo y otras estructuras del cerebro de mamíferos ha sido exhaustivamente estudiado como un modelo celular de almacenamiento de memoria. En un paralelo con la memoria, LTP también posee un primera fase de corta duración y una fase tardía permanente y dependiente de la síntesis de proteínas y de ARN. Estudios realizados sobre las distintas estaciones sinápticas del hipocampo han determinado que la vía AMPc-PKA es un componente crítico en el paso de la fase temprana a la fase permanente (Frey et al., 1993; Huang et al., 1995; Nguyen & Kandel, 1996; 1997; Matthies & Reymann, 1993; Roberson & Sweat, 1996). Sobre la base de estos resultados se ha propuesto entonces que la vía AMPc-PKA estaría involucrada en el paso de memoria de corto a largo término. Experimentos farmacológicos han comprobado esto inicialmente en pollos sujetos a una tarea de aprendizaje de evitación pasiva. Inyección intracerebral de un inhibidor de PKA antes del entrenamiento desarrolla amnesia a partir de una hora después de la experiencia (Serrano et al., 1994; Zhao et al., 1995). En ratones se ha comprobado mediante estrategias farmacológicas y genéticas que el bloqueo de la activación de PKA provoca exclusivamente amnesia de la memoria de largo término que se evidencia tres horas después del entrenamiento sin afectar la adquisición o memoria de corto término (Abel et al., 1997; Bourchouladze et al., 1998). En ratas, el entrenamiento de un aprendizaje de evitación pasiva induce aumento de la actividad de PKA y de fosforilación de CREB durante el periodo de consolidación (Bevilaqua et al., 1997; Bernabeu et al., 1997).

Los antecedentes citados muestran que el papel de PKA en mecanismos de memoria esta conservado en líneas filogenéticas distantes como ser moluscos, insectos, aves y mamíferos. Los primeros trabajos que mostraron el efecto de la manipulación farmacológica de la actividad de PKA sobre la memoria, basados en una medida comportamental, fueron realizados en el modelo experimental que fue usado en esta tesis, el modelo de aprendizaje del cangrejo *Chasmagnathus granulatus* (Romano et al., 1996a ; 1996 b).

## 1.6 El modelo de memoria usado en esta tesis

Resulta evidente, de los antecedentes mencionados, que es imposible explicar los mecanismos celulares implicados en aprendizaje y memoria o pretender hacer un repaso histórico de los hallazgos más relevantes en el tema, sin hacer referencia de una variedad de modelos y paradigmas experimentales tan variados como filogenéticamente distantes. Esta necesidad no resulta de un capricho por abarcar todos los ejemplos sino de que es la forma en que han avanzado las neurociencias, basadas en el estudio comparado y valiéndose de las ventajas y soluciones que distintos modelos proveen. Probablemente, el éxito de las neurociencias en los últimos 30 años haya sido gracias a esa diversificación y a la posibilidad de trasladar hallazgos de un modelo a otro y de trazar paralelismos entre los mecanismos que subyacen un fenómeno de plasticidad sináptica y los de un sistema extremadamente complejo como un animal que percibe, actúa y aprende. Sin embargo, el estudio comparado puede también conducir a errores como ser la interpretación de soluciones específicas como generales y a subestimar la riqueza de los mecanismos posibles para solucionar demandas ambientales similares. Siendo cauteloso de estos errores, el estudio comparado ha permitido estudiar y sacar provecho de similitudes y diferencias, y resulta sorprendente como funciones sensoriales, motoras y cognitivas fuertemente especializadas por efecto de adaptación a un nicho ecológico, se basan en soluciones celulares altamente conservadas, como el papel de neurotransmisores, neuromoduladores, señales de transducción y mecanismos de expresión génica. Esto ha dado sustento a un importante caudal de trabajos basados en el estudio de modelos simples o mejor dicho básicos, utilizando invertebrados, los que en muchos casos permiten un abordaje experimental más sencillo y un control preciso de los estímulos, de las respuestas y de lo aprendido.

Por otro lado, la diversidad de modelos y el análisis comparativo brinda a la biología información evolutiva. Esto es invaluable para un biólogo cuyo interés reside fuertemente en los mecanismos que proveen en un animal su adaptación a un nicho y en como esos mecanismos han surgido. De este modo el estudio de un biólogo orientado hacia el estudio del comportamiento animal,

abarca desde las causas próximas del comportamiento, tales como los mecanismos involucrados en la percepción de estímulos, procesamiento de la información, los fundamentos morfológicos, neuronales y moleculares que gobiernan el accionar de los animales, hasta las causas últimas del comportamiento, como ser los motivos históricos, ambientales y adaptativos que dieron origen al mismo.

En este contexto y satisfaciendo ambos enfoques mencionados, comenzaron hace más de 15 años los trabajos en el Laboratorio de Neurobiología de la Memoria de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Basados en la observación de campo de un comportamiento de componentes innatas y aprendidas del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, este modelo fue adoptado como objeto de estudio y reproducido en condiciones de laboratorio para el análisis paramétrico y mecanístico del aprendizaje y la memoria.

***Chasmagnathus granulatus*** es un cangrejo semiterrestre eurihalino, que habita en zonas intermareales. Taxonómicamente se ubica en la siguiente clasificación: Superclase: Crustacea

Clase: Malacostraca

Orden: Decapoda

Familia: Grapsidae

Genero: *Chasmagnathus*

Especie: *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851)



**Figura 1.4:** cangrejo *Chasmagnathus granulatus*, macho.

Además de las facilidades y ventajas generalmente atribuidas a los sistemas simples, *Chasmagnathus* muestra también conveniencias respecto de su accesibilidad y fácil manejo:

- a. Muestra una respuesta defensiva conspicua y estereotipada, evocable con facilidad, la que constituye la base del paradigma de aprendizaje y memoria que se utilizará en esta tesis. Esta respuesta es de muy fácil observación y cuantificación (Lozada et al., 1990)
- b. A diferencia de los vertebrados e insectos, los cangrejos carecen de barrera hematocerebral endotelial (Abbott, 1970) y poseen además una elaborada red de capilares en cerebro y ganglio nerviosos (Sandeman, 1967), lo que facilita el abordaje farmacológico mediante administraciones sistémicas de drogas a muy bajas concentraciones (Maldonado et al., 1997).
- c. Es un animal muy robusto a la manipulación y que además puede ser mantenido en buenas condiciones para la experimentación incluso varios días después de su captura.
- d. *Chasmagnathus* puede ser recolectado en grandes cantidades y durante prácticamente todo el año. El mantenimiento de estos animales en el laboratorio es también de muy bajo costo.

### **1.6.1 El Sistema Nervioso Central en Decápodos**

Si bien no es el objetivo central de esa tesis ahondar en aspectos morfológicos o neuroanatómicos de *Chasmagnathus*, resulta necesario brindar una breve introducción del tema, sobre todo desde una enfoque funcional de las principales estructuras nerviosas, para facilitar la interpretación del análisis bioquímico y farmacológico sobre el comportamiento, el aprendizaje y la memoria.

El sistema nervioso de decápodos se encuentra organizado en tres estructuras separadas anatómicamente, *los ganglios ópticos, el ganglio supraesofágico y ganglio torácico*, que se hallan vinculadas por nervios conectivos. Esta subdivisión anatómica no posee un fiel correlato funcional o evolutivo ya que

estructuras funcionales con un origen evolutivo definido se encuentran divididas y representadas separadamente en una y otra estructura anatómica. Tal es el caso del *protocerebro* que en esta familia está dividido en *protocerebro lateral* ubicado en los lóbulos olfatorios y *el protocerebro medial* que se encuentra dentro del denominado ganglio supraesofágico. También el *tritocerebro* se encuentra dividido y presente en ganglio supraesofágico y ganglio torácico.

Cada ganglio o estructura se encuentra a su vez subdividido en neuropilos. Algunos de estos neuropilos están ordenados geoméricamente, otros forman columnas o esferas de zonas sinápticas llamados glomerulos y otros no poseen estructuras geoméricamente ordenadas (Sandeman et al., 1993). Ciertas funciones primarias de estos neuropilos pueden deducirse debido a que sus aferencias y eferencias de órganos sensoriales o motores son fácilmente reconocibles.



**Figura 1.5: Sistema Nervioso Central de Decápodos**

**A:** vista dorsal del ganglio supraesofágico, AMPO: neuropilo protocerebral anteromedial; PB: puente protocerebral; CC: cuerpo central; NA: neuropilo antenal medial; NT: neuropilo tegumentario; LO: lóbulo olfatorio; TOG: tracto olfatorio glomeruloso; Co: comisura oesofágica

**B:** Diagrama de Neuropilos en los pedúnculo oculares: r: fotorreceptores; la: Lamina; me: medula externa; mi: medula interna; mt: medula terminalis; ch: cuerpo hemielipsoideo; ox: órgano X; sg: glándula del seno.

A continuación se enumeran las principales estructuras nerviosas y los neuropilos que las componen, en base a características conservadas dentro de los decápodos. Sin embargo, diferencias sobre todo en cuanto al tamaño de determinados neuropilos pueden existir como consecuencia de presiones ecológicas que conducen a un desarrollo diferencial de habilidades sensoriales. La siguiente descripción está hecha tomando como base el origen embriológico de tres estructuras, el *protocerebro*, *deutocerebro* y *tritocerebro*.

El **protocerebro** puede ser dividido en tres partes: *Ganglios ópticos*, *Protocerebro lateral* y *Protocerebro medial*. En el cangrejo, los dos primeros están ubicados dentro de los pedúnculos ópticos.

Los **ganglios ópticos** contienen a los siguientes neuropilos: *lámina*, *medula externa* y *medula interna*. Los axones ubicados en esta región están ordenados geométricamente. El patrón de mosaico de los fotorreceptores y los elementos ópticos de las omatideas de los ojos compuestos, se proyecta a través de los lóbulos ópticos en un arreglo columnar de neuronas. Esta estructura columnar se mantiene a lo largo de estos tres primeros neuropilos que son considerados como el órgano visual (Strausfeld & Nässel, 1980).

La *lámina* está compuesta por dos capas bien definidas por los niveles de terminales axónicas de fotorreceptores y árboles dendríticos de otras células. De las ocho células retinales que componen una omatidea, siete receptores verdes terminan en la lámina y el restante violeta en la *médula*, estableciendo que cierto procesamiento de color tiene lugar en este nivel (Wiersma et al., 1982; Nässel & Elofsson, 1987).

La organización en la *médula externa* está conformada por arreglos columnares y laminares. Al menos cuatro clases de neuronas se hallan en este neuropilo. Dos clases de neuronas de disposición laminar llevan directamente información a áreas protocerebrales. Las otras dos son neuronas exclusivamente locales y de disposición centrífuga hacia la *lámina* (Glantz and McIsaac, 1998).

La *médula interna* está formada por varias capas, que contienen neuronas locales y neuronas que la inervan de manera laminar y proyectan hacia el protocerebro lateral y medial; entre estas últimas se han identificado varias

neuronas detectoras de movimiento y trabajos recientes en *Chasmagnathus* han revelado un alto grado de correlación entre la actividad de estas neuronas y el grado de habituación a estímulos visuales móviles (Berón de Astrada & Tomsic, comunicación personal). Estas neuronas son probablemente pre-sinápticas a las pre-motoneuronas del tritocerebro y son parte integral del circuito subyacente a la respuesta defensiva de la langosta de río generadas por estímulos visuales (Nässel & Elofsson, 1987).

El **protocerebro lateral**, también ubicado dentro de los pedúnculos ópticos esta conformado por los neuropilos: *medula terminal* y *cuerpo hemielipsoideo*. Ambos neuropilos, aunque anatómicamente separados, derivan embriológicamente del protocerebro medio y están involucrados en el procesamiento de las señales visuales y en la integración de información olfativa (Bullock & Horridge, 1965; Baustein et al., 1988). El *cuerpo hemielipsoideo* es en decápodos la estructura análoga a los *cuerpos pedunculados* en insectos, y es considerado un área de procesamiento e integración sensorial (Gupta, 1987).

El **protocerebro medial**, se encuentra dentro del denominado ganglio supraesofágico. Está conformado por lo neuropilos anteriores, neuropilos posteriores, puente protocerebral y cuerpo central. Esta área no posee aferencias primarias sino de otros neuropilos y se ha postulado, debido a su configuración, que posee funciones asociativas y de procesamiento superior (Sandeman et al., 1992).

El **deutocerebro** se encuentra en su totalidad en el ganglio supraesofágico y posee aferencias primarias de naturaleza sensorial diversa. Los neuropilos que lo conforman son: los *lóbulos* o *glomerulos olfatorios* que reciben aferencias directas de los quimiorreceptores en la primer antena (Sandeman et al., 1993); *el neuropilo de la primer antena* que recibe información de mecanorreceptores en la primer antena y de donde salen las motoneuronas que controlan sus movimientos. También se encuentran aquí los *lóbulos accesorio*, *el neuropilo comisural deutocerebral* y *el neuropilo del tracto olfatorio glomerular*.

El **tritocerebro** se encuentra parte en el ganglio supraesofágico y parte en el torácico. El *neuropilo tegumentario* recibe aferencias sensoriales de la caparazón y el *neuropilo de la segunda antena* recibe información mecanosensorial y propioceptiva de la segunda antena y posee las motoneuronas para su movimiento (Sandeman et al., 1993).

### 1.6.2 El sistema sanguíneo intraganglionar

Existe un aspecto del sistema circulatorio del cangrejo que le otorga, como modelo, ventajas para las estrategias farmacológicas. Una gran red de sistemas capilares irriga el cerebro y los lóbulos ópticos. En *Chasmagnathus*, al igual que en otros Braquiuros, existen arterias que salen del corazón y llevan la hemolinfa directamente al SNC. Los capilares se abren descargando la hemolinfa en sinuosidades hemocélicas. Los vasos están distribuidos de tal manera que ninguna rama nerviosa en los neuropilos se encuentra a más de 20-25  $\mu\text{m}$  de los vasos sanguíneos y a menos de 200  $\mu\text{m}$  de los somas neuronales (Sandeman, 1967; Sandeman, 1982).

En insectos y vertebrados, existe una barrera de difusión entre los vasos sanguíneos cerebrales y las neuronas del SNC denominada barrera hematocerebral endotelial. En crustáceos, por el contrario no hay esta barrera endotelial que impida la difusión, de tal manera que una vez que la hemolinfa es impulsada hacia los capilares de SNC, la ausencia de barrera de difusión permite un rápido intercambio entre la sangre y los componentes celulares del neuropilo (Abbot, 1970).

### 1.6.3 El paradigma de aprendizaje

*Chasmagnathus granulata* despliega una respuesta característica de escape ante la presentación de un estímulo visual novedoso. Dicha respuesta de escape decae luego de pocas presentaciones del estímulo en las que el animal comprueba la inocuidad del mismo. La disminución de la respuesta de escape persiste por un largo tiempo (al menos 5 días) (Maldonado et al., 1997)

y no puede ser explicada en términos de fatiga motora o adaptación sensorial (Lozada et al., 1990). Resulta particularmente interesante que la capacidad de adquisición y de retención de la respuesta habituada de *Chasmagnathus* es sensiblemente superior a la de especies evolutivamente emparentadas (p.ej.: *Pachygrapsus marmoratus*), lo que evidencia a su vez un asombroso ajuste de las habilidades cognitivas a las presiones ecológicas (Tomsic et al., 1993). Esta memoria de largo término de *Chasmagnathus* es robusta, de adquisición rápida y su evocación es específica del estímulo y del intervalo entre estímulos con los que fue adquirida (Pedreira et al., 1997). La evocación de la respuesta aprendida es también específica de la fase circadiana en que fue adquirida (Pereyra et al., 1996).

Inicialmente, este proceso mnésico fue considerado como una clásica habituación de largo término y se lo denominó como tal (Lozada et al., 1990; Romano et al., 1990; Tomsic et al., 1993). Sin embargo, un análisis posterior, basado en las características de la retención inducida por protocolos de entrenamiento con distinta distribución temporal de la presentación del estímulo y experimentos de observación directa de las estrategias comportamentales, permitieron diferenciar la existencia de dos procesos de aprendizaje distintos, uno asociativo y otro no asociativo, ambos responsables del descenso de la respuesta de escape:

- a. La memoria de largo término se puede adquirir con 15 o más presentaciones del estímulo y con un intervalo entre estímulos de al menos 30 segundos ( **Entrenamiento Espaciado**) (Pedreira et al., 1997).
- b. Si el intervalo entre estímulos está entre 9 y 2 segundos, por lo menos 100 presentaciones son necesarias para inducir una retención a 24 horas (**Entrenamiento Masivo**) (Pedreira et al., 1997).
- c. La memoria de largo término inducida por un **Entrenamiento Espaciado** se establece por una asociación entre el contexto y la repetición del estímulo (Tomsic et al., 1998). Su evocación es inducida por la sola reinstalación en el contexto de entrenamiento y por lo tanto se evidencia como una

disminución de la respuesta de escape desde la primera presentación del estímulo durante la evaluación.

- d.** El **Entrenamiento Masivo** induce una retención que se evidencia recién desde la segunda presentación del estímulo durante la evaluación, siendo necesaria la primera presentación como recordatorio.
- e.** La reducción del nivel de escape inducido por un **Entrenamiento Espaciado** se produce por un cambio de la estrategia defensiva desplegada por el animal ante la presentación del estímulo: El animal deja de escapar y exhibe una respuesta críptica (permanece inmóvil) o "freezing". El descenso de la respuesta de escape producido por el **Entrenamiento Masivo** no se debe a la adopción de una estrategia defensiva sino a la adquisición de un estado de "indiferencia" al estímulo (Pereyra et al., 2000).
- f.** El caso extremo en el cual los intervalos entre ensayos se eliminan completamente, se denomina **entrenamiento continuo** y solo induce un descenso de la respuesta de escape a corto término y la recuperación completa a las 24 horas.

Estas características permitieron determinar que la reducción en la respuesta de escape inducida por la presentación reiterada del estímulo, inicialmente denominada habituación, se debe a la existencia de dos procesos aislados:

**Memoria Contexto-Señal (MCS):** adquirida por Entrenamiento Espaciado: 15 o más ensayos separados por intervalos de al menos 30 segundos

**Memoria Señal (MS):** adquirida por un Entrenamiento Masivo; 100 o más ensayos con intervalos menores de 9 y mayores de 2 segundos

Hoy en día estos dos paradigmas han sido caracterizados y diferenciados de manera mecánica y farmacológica, y existen evidencias de que ambos son inducidos paralelamente por un entrenamiento espaciado y de manera simultánea contribuyen a la evocación.

En la tabla 1.1 se enumeran las principales características de ambos paradigmas (Hermitte et al., 1999; Pedreira et al., 1997; Pereyra et al., 1996, 2000).

	<b>Memoria Contexto-Señal</b>	<b>Memoria Señal</b>
<b>Adquisición y Evocación</b>		
<b>Adquisición</b>	≥15 ensayos >30 seg de intervalo entre ensayos	>100 ensayos 2 seg < intervalo entre ens. < 9 seg
<b>Evocación</b>	Desde el primer ensayo en una sesión de evaluación y toda la fase de re-entrenamiento	Desde el segundo ensayo y fase de re-entrenamiento
<b>Contexto especificidad</b>	Memoria específica y asociada al contexto	Memoria no asociada al contexto (evocación contexto-inespecífica)
<b>Persistencia</b>	Al menos por 5 días	Hasta 48 horas

**Tabla 1.1**

#### **1.6.4 Caracterización farmacológica de dos procesos de memoria**

Sumado al aspecto ventajoso que ofrece *Chasmagnathus* para el acercamiento farmacológico experimental, existe una característica mas que ha favorecido el estudio mecanístico y que no se relaciona directamente con el modelo sino con el paradigma de aprendizaje utilizado. Esta característica, que a veces según el objetivo del experimentador puede ser vista como un obstáculo, consiste en que el entrenamiento necesita de varias repeticiones o ensayos para inducir una memoria de largo término. Como ya fue indicado, al menos 15 ensayos son necesarios para inducir una buena retención a 24 horas. Sin embargo, por ejemplo, 10 ensayos son suficientes para inducir una buena memoria de corto término. Este protocolo de entrenamiento débil, brinda una condición en la cual los animales han adquirido un aprendizaje, pero la experiencia no ha tenido la fuerza suficiente para inducir los mecanismos de consolidación de la memoria de largo término.

Existe una ventaja en el hecho de que dos protocolos induzcan resultados distintos tan solo por diferencias en la cantidad de entrenamiento. Esto ofrece la posibilidad de evaluar la hipotética intervención de un mecanismo en el proceso de formación de memoria abordándolo experimentalmente desde ambos lados, es decir bloqueándolo o también facilitándolo. Por ejemplo, un protocolo de entrenamiento fuerte, conformado por 15 o más ensayos, permite evaluar el papel de determinado receptor o vía metabólica, evaluando si su bloqueo o intervención farmacológica muestra efecto amnésico. Un protocolo débil, permite confirmar el papel de dicho mecanismo, en la medida que una intervención farmacológica facilitadora de dicho mecanismo simule los efectos del protocolo de entrenamiento fuerte.

Las conclusiones derivadas solo de resultados amnésicos han sido en muchos casos criticadas, bajo el argumento de que los efectos amnésicos pueden también ser explicados en términos de efectos colaterales o inespecíficos por el hecho de intervenir o desajustar el equilibrio del metabolismo en general. La posibilidad en cambio de trabajar con ambas estrategias en conjunto, amnésica y facilitadora, suman evidencia independiente en favor del papel específico de un mecanismo en el proceso evaluado.

Sacando provecho de la conveniencia del modelo para administración de drogas por vía sistémica y combinando el uso de protocolos de entrenamiento espaciados fuertes y débiles y protocolos de entrenamiento masivo, se ha hecho una importante caracterización farmacológica de los procesos de **MCS** y **MS** que se resume en la tabla 1.2 (Pedreira et al., 1996; Delorenzi & Maldonado, 1999; Berón de Astrada & Maldonado, 1999; Hermitte et al., 1999; Merlo et al., 2002, Troncoso & Maldonado, 2002).

Los opioides juegan un papel importante en la memoria de corto término, ya que se ha demostrado que están involucrados en la caída de la respuesta de escape que se produce durante la sesión de entrenamiento. Las evidencias sugieren que, en *Chasmagnathus*, los opioides endógenos intervienen en el descenso de la respuesta de escape disminuyendo la percepción de los estímulos a nivel central (Brunner & Maldonado, 1988; Maldonado et al., 1989;

Romano et al., 1990; Tomsic & Maldonado, 1990; Tomsic et al., 1991; Godoy & Maldonado, 1995).

	<b>Memoria Contexto-Señal</b>	<b>Memoria Señal</b>
<b>Farmacología</b>		
<b>Angiotensinas</b>	Modulado positivamente por las angiotensinas endógenas (Angiotensina = facilitadora) (Saralasin = Amnésica)	Modulado positivamente por las angiotensinas endógenas.
<b>Acetilcolina</b>	Dependiente de mecanismos muscarínicos (bloqueado por escopolamina y facilitada por oxotremorina)	No es afectada por escopolamina.
<b>Glutamato</b>	Dependiente de receptores de Glutamato tipo NMDA (bloqueado por APV y MK801)	Independiente de receptores tipo NMDA
<b>Cicloheximida Actinomicina D</b>	Dependiente de la síntesis de ARN y proteínas	Independiente de la síntesis de ARN y proteínas
<b>Activación de FT</b>	Dependiente de la activación de factores transcripción Rel/NFkB	No induce activación de Rel/NFkB

**Tabla 1.2**

### 1.6.5 Papel de la vía AMPc-PKA en la formación de MCS

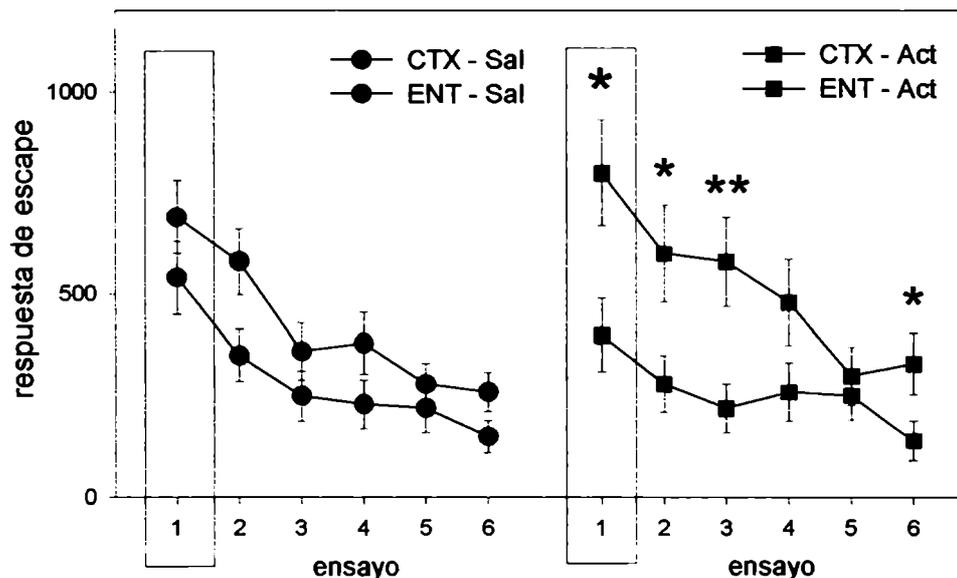
El efecto de la activación e inhibición farmacológica de la vía de AMPc-PKA sobre un proceso de memoria fue probado por primera vez en *Chasmagnathus* y sobre la formación de MCS. Estos resultados fueron determinados mediante el esquema experimental planteado anteriormente combinando protocolos de entrenamiento espaciado fuertes y débiles y la administración sistémica de drogas.

La primer serie de experimentos fue realizada sometiendo a los animales a un protocolo de entrenamiento débil y la administración de una combinación de drogas con el fin de estimular PKA. Se administró un activador de PKA análogo al AMPc y permeable a membrana plasmática (8-(4-clorofeniltio)-

AMPcíclico), junto con el inhibidor de fosfodiesterasa, isobutil-metil xantina (IBMX). Esta administración mostró efecto facilitador simulando los efectos de un protocolo de entrenamiento fuerte (Romano et al., 1996 a). Sin embargo, dicho efecto facilitador no puede ser con certeza atribuido a la activación de PKA, ya que el análogo utilizado es también activador de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) y que además el IBMX inhibe la enzima fosfodiesterasa provocando también un aumento del GMPc endógeno.

Para confirmar el papel de PKA en la formación de MCS, se utilizaron luego dos análogos de AMPc altamente específicos por PKA, no hidrolizables por fosfodiesterasa de manera de evitar el uso de IBMX. El análogo de AMPc, Sp-5,6-DCI-cBIMPS, activador de PKA mostró un claro efecto facilitador de la memoria de largo término administrado junto a un protocolo de entrenamiento débil de solo 5 ensayos (figura 1.6).

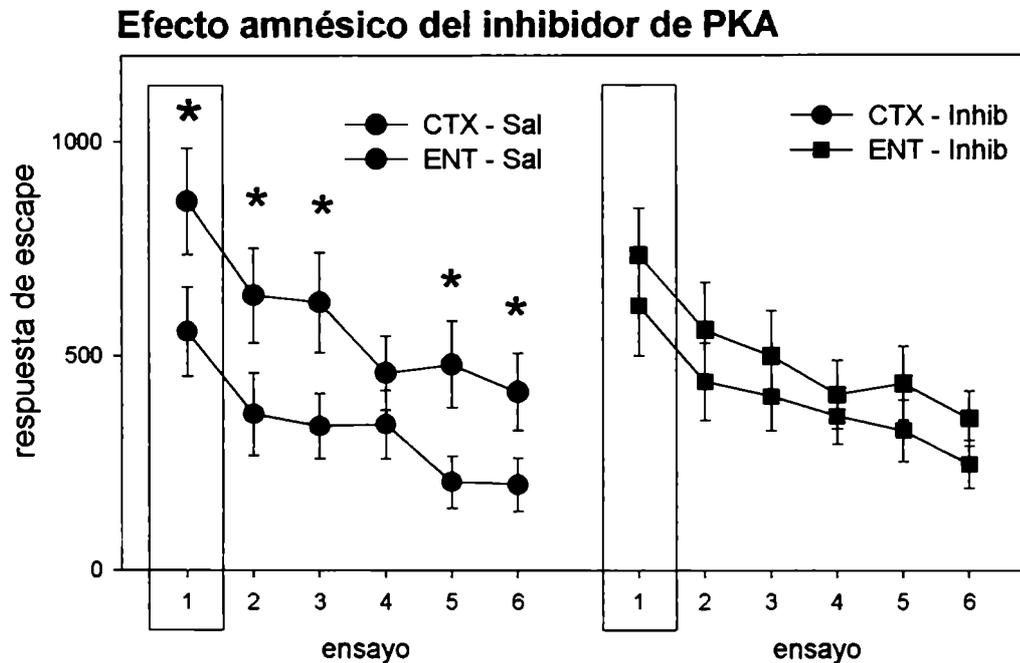
### Efecto facilitador del activador de PKA



**Figura 1.6 Efectos de la activación de PKA sobre la memoria de largo término en *Chasmagnathus*.** (Romano et al., 1996b).

Los gráficos muestran la respuesta de escape (media ± ES) durante una sesión de evaluación de la memoria de largo término; Animales no entrenados y animales entrenados con un protocolo de entrenamiento débil (5 estímulos), recibieron inyección de solución salina o activador de PKA. El primer ensayo muestra que el entrenamiento débil resulta insuficiente para inducir retención y que el activador de PKA resulta facilitador aumentando la retención de la respuesta adquirida. (\* P<0.05, comparaciones planeadas).

El análogo inhibidor de PKA, Rp-8-CI-cAMPS, revirtió el efecto de un protocolo de entrenamiento fuerte de 15 ensayos, mostrando efecto amnésico (figura 1.7).



**Figura 1.7. Efecto del Inhibidor de PKA sobre la memoria de largo término en *Chamagnathus*.**

Los gráficos muestran la respuesta de escape durante la sesión de evaluación de la memoria de largo término. Animales no entrenados o entrenados con un protocolo de entrenamiento fuerte, fueron inyectados con solución salina o inhibidor de PKA. Como muestra el primer ensayo se observa retención entre los animales inyectados con salina. La retención de largo término es bloqueada por el inhibidor de PKA. (\*  $P < 0.05$ , comparaciones planeadas).

(Romano et al., 1996 b)

## 1.7 Hipótesis y Objetivos

El marco teórico que agrupa las hipótesis y objetivos planteados en esta tesis, comprende, de acuerdo con lo explicado a lo largo de esta introducción, que las vías intracelulares de transducción de señales juegan un papel fundamental en la construcción de la representación neural de la memoria.

El objetivo general de esta tesis es un estudio exhaustivo de la participación de la vía de transducción de AMPc-PKA en la formación de una memoria de largo término en el modelo del cangrejo *Chasmagnathus granulatus*.

Los antecedentes farmacológicos que prueban un papel de la vía de AMPc-PKA en la formación de memoria en *Chasmagnathus* constituyen resultados obtenidos durante mi tesis de licenciatura y son el punto de partida de la presente tesis.

La hipótesis de este trabajo consistió en considerar que la acción de PKA constituye un evento de la conversión de la memoria de corto a largo término en *Chasmagnathus*. Que la acción de PKA es un fenómeno intrínseco del proceso mnésico, inducido por el propio patrón de estímulos que induce la formación de la memoria y no mediando efectos moduladores sobre la misma.

Por otro lado, considerando la diversidad de efectos fisiológicos mediados por PKA y las consecuencias específicas y puntuales de su acción en cada caso, se ha evaluado en esta tesis la participación diferencial de isoformas de PKA como posible solución a esa especificidad.

A continuación resumiré los objetivos particulares planteados para esta tesis, los cuales serán luego explicados en detalle a lo largo de los siguientes capítulos en los que esta organizada esta tesis:

- a.** El primer objetivo de esta tesis fue determinar la participación de PKA durante las etapas de adquisición, consolidación y evocación de la memoria y definir los límites temporales de su acción. Con este propósito se utilizó una estrategia farmacológica para la inhibición reversible de PKA. (Capítulo III).
- b.** La segunda serie de objetivos responde a preguntas de orden descriptivo, que surgen de la ausencia de conocimiento previo acerca de las características de PKA en crustáceos en general. En esta tesis se propuso determinar: a) las condiciones para medir actividad de PKA en sistema nervioso de *Chasmagnathus*; b) la distribución de la enzima en sistema nervioso; c) su activación por neurotransmisores (Capítulo IV) y d) la presencia y caracterización de isoformas (Capítulo VI).

- c.** El tercer objetivo fue determinar si el patrón de estímulos que induce la formación de la memoria de largo término, induce también cambios en los niveles de actividad de PKA. Mediante una estrategia bioquímica y de correlación se apuntó a determinar si el efecto de la intervención farmacológica de PKA sobre la memoria, es producto una acción moduladora o de la intervención sobre un proceso intrínseco de la memoria (Capítulo V).
- d.** El último objetivo de esta tesis fue determinar si existe una participación diferencial de las isoformas de PKA en procesos de memoria, y a su vez si esa participación es específica para distintos procesos mnésicos (Capítulo VII).



## **Capítulo II**

# **Materiales y Métodos Generales**



Los materiales y procedimientos comunes a toda esta tesis son explicados en este capítulo. Algunos procedimientos y protocolos específicos serán explicados en los capítulos sucesivos capítulos así como los procedimientos y la progresión que llevo a establecer dichos protocolos.

## 2.1 Animales, procedencia, mantenimiento

### 2.1.1 Animales

En toda esta tesis se utilizaron cangrejos *Chasmagnathus granulatus* provenientes de una población natural. Los individuos utilizados siempre fueron machos adultos y en un rango de tamaño específico, entre 26 y 30 mm de ancho de caparazón (figura 2.1). El peso húmedo promedio de los individuos era de 15 gr.

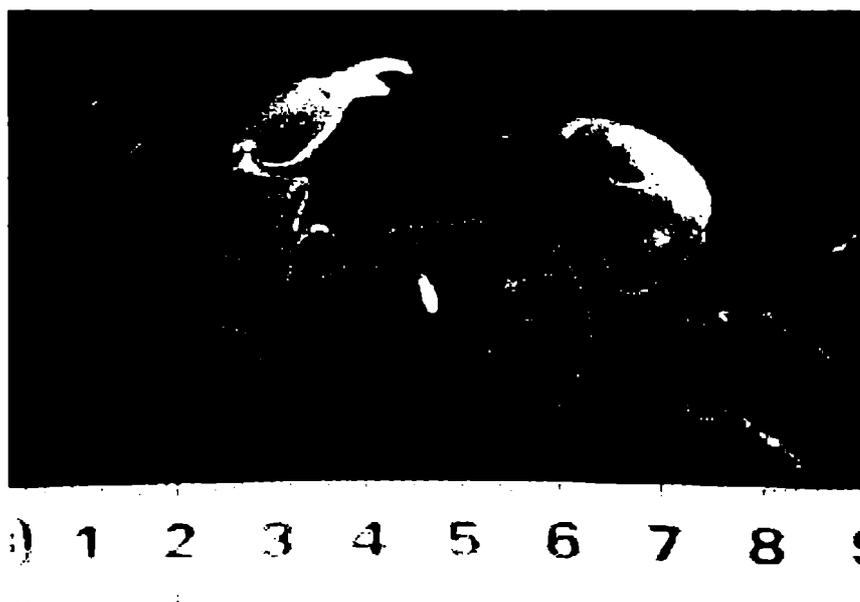


Figura 2.1

### 2.1.2 Lugar de captura

*Chasmagnathus granulatus* es un cangrejo eurihalino que habita las zonas costeras del sur de Brasil, Uruguay y Provincia de Buenos Aires, Argentina, ocupando bancos de limo mesolitoral y supralitoral de la zona de transición de

agua dulce y marina. El lugar de captura de los animales para esta tesis fue en las rías de agua salobre de San Clemente del Tuyú, Prov. de Buenos Aires. Luego de su captura, los cangrejos eran transportados al laboratorio en recipientes especialmente diseñados para impedir el hacinamiento de los animales durante el transporte. La recolección de animales se realizó durante prácticamente todo el año y aproximadamente cada 15 días.

### **2.1.3 Mantenimiento de los animales**

Durante su permanencia en el laboratorio y hasta ser utilizados, los animales eran mantenidos en un ambiente de acceso restringido, luz y temperatura controladas denominado *cangrejario*. Este ambiente se encuentra su vez subdividido en gabinetes aislados para asegurar la menor cantidad de perturbaciones y estrés a los animales. Dentro de cada gabinete los animales se encuentran alojados en tanques plásticos rectangulares de 35 x 50 cm de base y 27 cm de altura, a una densidad de 20 animales por recipiente. Los tanques tienen un fondo de agua salobre de 2 cm de profundidad. El agua salobre esta preparada con agua corriente declorada y sal marina para acuarios (Red-Sea, Israel) a una salinidad de 12 ‰ y pH 7,4 – 7,6. Los animales son mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad de 12L:12O (7:00 – 19:00 luz) y a una temperatura ambiente entre 20 y 24 °C.

Cada tres días los animales eran alimentados con alimento balanceado para conejos (Nutrientes S.A., Argentina) y 3-4 horas después de la alimentación se renovaba el agua de los tanques.

## **2.2 Comportamiento y medición**

### **2.2.1 La respuesta de escape**

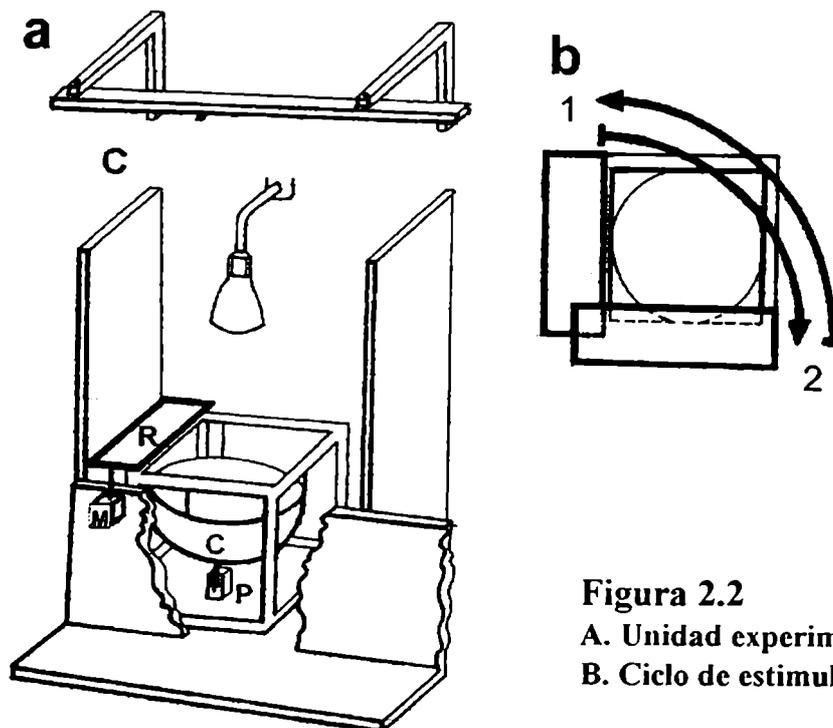
Como *Chasmagnathus*, los cangrejos que habitan zonas intertidales, muestran antes estímulos que acarrear probables peligros una respuesta de escape conspicua y estereotipada. Lo marcado de este comportamiento, ha hecho que sirva de substrato para estudiar a nivel comportamental el procesamiento de la información visual, la integración de estímulos, mecanismos de orientación

(Nishimoto & Herrmkind, 1978; Nalbach, 1987, 1990) y para estudios electrofisiológicos con el objeto de estudiar la circuitos neuronales que vincula la percepción visual con el sistema motor (Nalbach, 1990; Berón de Astrada et al., 2001; Berón de astrada & Tomsic., 2002).

En su hábitat natural, resulta sorprendente como *Chasmagnathus* reacciona rápida y sensiblemente a pequeños movimientos de objetos nuevos o introducidos en su campo visual con una vigorosa reacción de escape alejándose del objeto y en dirección al agua o hacia la cueva. Sin embargo, este cangrejo muestra una marcada habituación al movimiento de objetos con probada inocuidad. Este comportamiento, considerado como el aprendizaje acerca de la inocuidad de un estímulo visual fue trasladado al laboratorio y reproducido de manera tal de controlar muy precisamente la presentación de los estímulos y de cuantificar la magnitud de la respuesta de escape.

### 2.2.2 Estimulación y registro de la respuesta de escape

Para evocar la respuesta de escape de *Chasmagnathus* y medir su magnitud en condiciones de laboratorio se utiliza un dispositivo denominado *actometro* (figura 2.2). La sala de experimentación posee 40 de estas unidades de modo que permite al experimentador trabajar con 40 animales en forma simultanea.



**Figura 2.2**  
**A. Unidad experimental: Actometro**  
**B. Ciclo de estimulación**

Cada *actometro* consta de un recipiente plástico (C) de forma semi-esférica con paredes cóncavas y un fondo circular plano cubierto hasta 0.5 cm de agua salobre. El recipiente suspende por tres hilos de una estructura de madera y es iluminado con una lámpara de 10 W ubicada a 30 cm por encima. La base del recipiente se encuentra conectada a un transductor piezoeléctrico (P). Durante un experimento, un animal es alojado en el recipiente, y las vibraciones del recipiente producto de los movimientos del animal son convertidas por el transductor en señales eléctricas proporcionales. Las señales son amplificadas e integradas durante el tiempo de registro y traducidas por una computadora a una escala numérica.

Para evocar la respuesta de escape, existe una pantalla rectangular opaca (R) que movida por un motor (M) se desplaza horizontalmente entre el *actometro* y la iluminación, a la vista del animal alojado en el. Esto desencadena una respuesta de escape del animal en dirección definida y opuesta al movimiento de la pantalla. La forma del recipiente, sin borde ni ángulos internos provoca que el animal no encuentre refugio y la concavidad de las paredes hacen que el animal siempre vuelva al fondo plano del mismo, por lo que la respuesta de escape siempre se desencadena en el centro del recipiente.

El rango de vibraciones detectado por el transductor piezoeléctrico, permite diferenciar entre un estado de inmovilidad del animal, la actividad exploratoria o locomotora básica y un vasto rango de magnitudes de respuesta de escape.

La estimulación y el registro de los cuarenta *actómetros* es controlado desde una computadora. Esta permite programar secuencias de estimulación, conformadas por el número de pasajes de la figura e intervalos deseado. Permite a su vez programar distintas secuencias simultaneas para los distintos *actómetros*, de modo de tener distintos grupos experimentales simultáneamente y a su vez registrar la respuesta de escape de cada uno.

### **2.2.3 Ensayo de estimulación**

A lo largo de esta tesis se denomina ensayo a una estimulación que consiste en dos ciclos del pasaje de la pantalla. Cada ciclo comprende el movimiento de la pantalla desde una posición 1, hasta una posición 2, y el regreso a la

posición 1 lo que dura aproximadamente 2.5 segundos (figura 2.2b). El ensayo completo tiene una duración total de 9 segundos, conformado por 2 ciclos del pasaje de la figura y dos intervalos de 2 segundos (ciclo-intervalo-ciclo-intervalo). Durante los nueve segundos se registra e integra la actividad del animal.

El diseño cíclico del ensayo, con la pantalla moviéndose en ambas direcciones encierra un propósito que es el de asegurarse que la pantalla entre en el campo visual de los animales por mas de un lado, garantizando una estimulación similar en todos los animales, independiente de la ubicación y sentido que cada animal haya adoptado en el recipiente.

## 2.3. Procedimientos de entrenamiento y evaluación

En esta tesis se realizaron experimentos farmacológicos con evaluación comportamental y experimentos bioquímicos, ambos en relación con aprendizaje y memoria. Todos los experimentos farmacológicos se basaron en un diseño de dos sesiones de estimulación separadas por periodos de 24 o 48 hs., tal que la primera sesión de estimulación consiste en lo que se denomina sesión de entrenamiento y la segunda en la sesión de evaluación. Los experimentos bioquímicos constan solo de la sesión de entrenamiento.

En la sesión de entrenamiento los animales son colocados por primera vez en el dispositivo experimental. Se define **animales entrenados** a los que reciben la presentación reiterada del pasaje de la figura y **animales contexto** a los que durante el mismo periodo permanecen en el dispositivo sin ser estimulados. Durante la sesión de evaluación todos los animales reciben la estimulación.

### 2.3.1 Criterio de selección de los animales

Antes de comenzar con la sesión de entrenamiento cada animal era sujeto a una prueba comportamental que revela su estado general y locomotor. Cada animal es tomado y apoyado dado vuelta sobre su región dorsal y solo si el animal reincorpora rápidamente su postura original es utilizado para el experimento. El argumento para utilizar esta prueba de selección es que los

sujetos lentos en esta reacción suelen mostrar problemas locomotores o morir a los pocos días.

### **2.3.2 Protocolo de entrenamiento espaciado**

Como ya fue explicado en la introducción, el entrenamiento espaciado induce la formación de memoria contexto-señal (**MCS**). Este tipo de memoria se estudió en esta tesis tanto en experimentos farmacológicos (Capítulo III) como bioquímicos (Capítulo V y VII).

El entrenamiento espaciado consistió en 15 ensayos de 9 segundos de duración presentados en intervalos de 3 minutos (171 segundos entre ensayos). El protocolo completo incluye colocar al animal en el actómetro, dejarlo 5 minutos para adaptación al actómetro y luego comienza la sesión de estimulación de 45 minutos. Los animales contexto tienen un total de 50 minutos de estadía en el actómetro sin ser estimulados. En todos los experimentos en los que hay más de un grupo experimental o tratamiento, la sala experimental fue dividida y todos los tratamientos realizados simultáneamente. Una vez finalizado el entrenamiento, los animales eran utilizados de acuerdo a lo indicado en cada caso particular o alojados en recipientes individuales con un fondo de agua salobre de 0.5 cm de profundidad e iluminación tenue hasta el momento de ser utilizados o evaluados.

La evaluación consiste en volver a colocar a los animales en los actómetros, dejarlos nuevamente 5 minutos para adaptación y luego comienza la estimulación consistente en seis ensayos, presentados en intervalos de 3 minutos.

### **2.3.3 Protocolo de entrenamiento masivo**

El protocolo de entrenamiento masivo, se utiliza para inducir la formación de memoria señal (**MS**). Este protocolo de entrenamiento está conformado por unidades de ensayos de 9 segundos, similar al protocolo espaciado y tiene la misma duración total, pero cambia el número de ensayos y el intervalo entre los

misimos. El intervalo entre ensayo se redujo a 0 segundos y el número de ensayos se llevó a 300. De acuerdo al diseño de ensayo explicado anteriormente, de dos ciclos de 2,5 segundos y dos intervalos de 2 segundos por ensayo, el entrenamiento masivo podría también ser entendido como 600 ensayos de un único ciclo con intervalos de 2 segundos. Remarcar la existencia de los pequeños intervalos de dos segundos resulta importante, ya que si esos intervalos se eliminan convirtiendo al entrenamiento en el movimiento ininterrumpido de la figura, condición denominada entrenamiento continuo, entonces solo existe una reducción de la respuesta de escape de corto término sin la formación de una memoria intermedia o de largo término, MCS o MS.

El protocolo completo incluye los 5 minutos de adaptación al actometro y los 45 minutos de entrenamiento con la implementación de grupos entrenados y grupos contexto. Luego del entrenamiento existe un intervalo entre sesiones de 24 horas y una sesión de evaluación de 6 ensayos presentados sin intervalo.

## **2.4 Evaluación de la retención**

La retención de la memoria de largo término es definida operacionalmente como la diferencia significativa entre los grupos contexto y entrenados en el nivel de la respuesta de escape durante la sesión de evaluación. Es decir, para ponderar la memoria a largo término se enfoca el análisis de los datos en los niveles de respuesta de la evaluación y no comparando la respuesta obtenida para en el entrenamiento con la obtenida en la sesión de evaluación. Rescorla (1988), ha argumentado en forma convincente a favor de utilizar este tipo de análisis en vez de la comparación entrenamiento-evaluación, puntualizando la necesidad de distinguir entre el tiempo de adquisición de la información y el tiempo de evaluación. Un hecho que justifica este tipo de comparación es que el comportamiento del animal puede diferir entre las sesiones por razones no relacionadas con el aprendizaje. Esta visión esta especialmente fundamentada en el modelo utilizado en esta tesis, considerando resultados previos que demuestran que la memoria contexto-señal (MCS), puede formarse independiente del nivel de la respuesta de escape durante el entrenamiento

(Tomsic et al., 1991). Un hallazgo coincidente con otros modelos (Applewhite, 1969, Peeke, 1976).

## 2.5 Definiciones

Este conjunto de términos es de uso corriente a lo largo de esta tesis:

**Habitación de corto término:** Es el decremento de la respuesta de escape dentro de la sesión de entrenamiento.

**Habitación de largo término:** Decremento de la respuesta de escape mantenido por al menos 24 hs.

**Memoria Contexto-Señal:** es una memoria asociativa y de largo duración adquirida por entrenamiento espaciado. El término hace referencia a que esta memoria se basa en una asociación entre el contexto (entorno experimental) y la señal (estímulo fásico de la figura en movimiento).

**Memoria Señal:** es la memoria no asociativa y de duración intermedia generada por un entrenamiento masivo.

**Contexto:** define al conjunto de claves ambientales (visuales, táctiles, etc,..) presentes en el lugar de entrenamiento y de evaluación.

# Capítulo III

**Curso temporal de la acción de PKA en la  
consolidación de la memoria contexto-señal  
en *Chasmagnathus***



### 3.1 Introducción

En el capítulo I de esta tesis ya ha sido introducido el concepto de que la memoria no debe ser entendida como un proceso único sino como una serie de procesos consecutivos y dependientes: adquisición, consolidación, almacenamiento y evocación. Distintos mecanismos celulares y moleculares participan en cada una de estas instancias y la deficiencia en cualquiera de estas se evidencia como la falta de memoria durante la evocación.

Durante el periodo de consolidación de la memoria de largo término se suceden formas de memoria que retienen la información solo temporalmente comúnmente conocidas como memoria de corto termino e intermedia. Los mecanismos celulares que subyacen cada una de estas formas de memoria y la instalación de las mismas pueden o no ser comunes pero esencialmente se diferencian en el tiempo requerido para su instalación y su estabilidad en el tiempo.

Cuando el objeto de estudio son los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la memoria, entendiendo a la formación de la memoria de largo término como un proceso en el cual distintos eventos deben sucederse en forma coordinada, cabe preguntarse en cual de las etapas de la memoria participa el mecanismo investigado e, hilando aun mas fino, en que preciso momento del proceso de consolidación interviene. Estas preguntas no permiten ser abordadas experimentalmente por estrategias interventivas de tipo irreversible o de efecto lento ya que en dichos casos resulta imposible definir cual fue la etapa o el período interferido y cualquiera de ellos que haya sido, el efecto se evidenciará en la evocación.

La participación de la vía de transducción de AMPc-PKA en aprendizaje y memoria ha sido probada para diversos modelos y paradigmas: condicionamiento olfatorio *Drosophila* (Davis, 1996, Drain et al., 1991, Yin et al., 1995), en la abeja *Apis mellifera* (Fiala et al., 1999; Müller, 2000) en la facilitación presináptica que subyace la sensibilización en *Aplysia* (Kandel & Schwartz, 1982), y en mamíferos tanto en paradigmas de memoria (Bourtchouladze et al, 1994; Bernabeu et al., 1996; Guzowski & McGaugh, 1997; Abel et al., 1997) como en la plasticidad sináptica en hipocampo (Frey et

al., 1993; Huang & Kandel, 1994; Huang et al., 1995; Abel et al., 1997), mecanismo propuesto como modelo celular de almacenamiento de información.

A pesar de la vasta lista de antecedentes que confirman el papel de esta vía de transducción en la memoria, muy pocos trabajos han disecado temporalmente los requerimientos de PKA durante las distintas etapas de la memoria o definido los periodos de acción de esta vía durante su formación. En *Aplysia* se ha determinado que la activación de PKA es fundamental para la expresión de la facilitación de corto término y requerida durante las primeras doce horas después de la inducción para la expresión de la facilitación de largo término. Una vez consolidada se hace independiente de la actividad de PKA (Hegde et al., 1997). Un perfil distinto de actividad de PKA se ha determinado durante la formación de memoria en roedores, demostrándose que la activación de PKA es necesaria en los primeros minutos después del entrenamiento y dependiendo del tipo de entrenamiento en un segundo periodo entre 3 y 6 horas después del mismo (Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998). En contraste con *Aplysia* se ha demostrado también en roedores que la activación de PKA posee también efecto durante la evocación (Szapiro et al., 2000).

De acuerdo con el objetivo central de esta tesis, que es determinar el papel de la vía de transducción AMPc-PKA en la formación de memoria de largo término, en el capítulo presente nos valemos de una estrategia farmacológica reversible para intervenir esta vía de transducción durante las distintas fases de la formación de memoria y en distintos momentos del período de consolidación.

Existen evidencias previas del papel de esta vía de transducción en la formación de memoria contexto señal del cangrejo (Romano et al, 1996a, b) que constituyen resultados obtenidos durante mi tesis de Licenciatura. Sin embargo no se han determinado los límites temporales de la acción de PKA en la formación de la memoria ni tampoco si el requerimiento de PKA es una característica común de todos los procesos de aprendizaje y memoria en cangrejo.

Los objetivos específicos de este capítulo pueden entonces resumirse en:

- 1) Determinar las fases de la memoria dependientes de la actividad de PKA; adquisición, consolidación y evocación.
- 2) Determinar en que periodo durante el proceso de consolidación es requerida la actividad de esta vía de transducción.
- 3) Establecer si la actividad de PKA es también necesaria para la formación de la memoria intermedia o memoria señal.

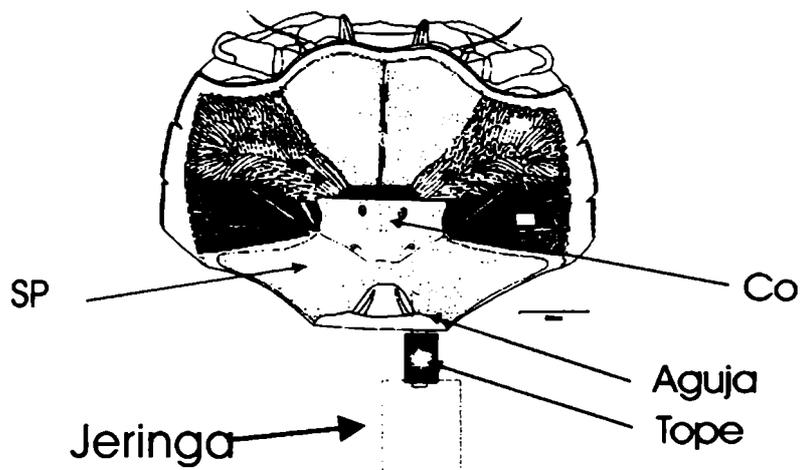
## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Drogas e inyecciones

Como vehículo para las drogas y para los animales inyectados sin drogas se utilizó solución salina para crustáceos (Hoeger & Florey, 1989).

Para inhibir PKA de manera reversible se utilizó un análogo de AMPc, 8-cloroadenosin-3',5'- monofosforotioato, isomero Rp, provisto por Biolog (Alemania). En todos los experimentos el inhibidor de PKA fue utilizado a una concentración de 100  $\mu$ M en solución salina.

Las inyecciones consistían en 50 $\mu$ l de la solución salina o de 100 $\mu$ M del inhibidor de PKA en solución salina administrada mediante una jeringa a través de la membrana cefalotorácica abdominal y controlando una penetración de la aguja de 4mm ( figura 3.1).



**Figura 3.1:** Sección de *Chasmagnathus*, donde se indica el lugar de administración de las inyecciones sistémicas. Co: Corazón; SP: Seno Pericárdico

Estas condiciones aseguran la administración de la droga en el centro del seno pericárdico del animal. Si bien esta constituye una administración sistémica de la droga, la organización del sistema circulatorio de decápodos y la ausencia de una barrera hemática endotelial (Abbot, 1970) proveen de una rápida y efectiva llegada de las drogas a los ganglios nerviosos.

El volumen de hemolinfa estimado en los animales utilizados es de aproximadamente 5 ml, 30% de su peso corporal (Gleeson & Zubkoff, 1977). Este volumen de hemolinfa y el volumen de la inyecciones implica una dilución de la concentración de droga en la hemolinfa del cangrejo a aproximadamente  $1\mu\text{M}$ .

La manipulación propia de la inyección, y el volumen de vehículo administrado han demostrado no afectar la reactividad o capacidad de aprendizaje del animal.

### **3.2.2 Procedimiento experimental**

Cada experimento incluyó dos sesiones: la sesión de entrenamiento y la sesión de evaluación, separadas entre si por un intervalo de 24 h, excepto en un experimento en el cual el intervalo fue de 48 h.

Cada experimento se conformó por un grupo de animales entrenados (**ENT**) y un grupo de animales que permaneció en el contexto de entrenamiento por el mismo tiempo que los animales ENT pero sin recibir estimulación (**CTX**). Cada uno de estos grupos fue dividido en dos para recibir inyección de solución salina (**Sal**) o del inhibidor de PKA (**Inh**) quedando así conformados 4 grupos:

<b>Contexto - Salina</b>	<b>(CTX-Sal)</b>
<b>Entrenado - Salina</b>	<b>(ENT-Sal)</b>
<b>Contexto - Inhibidor</b>	<b>(CTX-Inh)</b>
<b>Entrenado - Inhibidor</b>	<b>(ENT-Inh)</b>

Dado que en la población de cangrejos utilizada puede existir heterogeneidad de la respuesta de escape, previo al inicio de la sesión de entrenamiento los animales eran sometidos a una prueba de reactividad: esto es, una vez colocados en el actómetro antes de comenzar el entrenamiento los animales eran sometido a un ensayo único de estimulación y de acuerdo a la reactividad

inicial mostrada en este ensayo eran ordenados y distribuidos en grupos experimentales homogéneos. Este procedimiento asegura una respuesta media de escape similar entre grupos al inicio de los experimentos y una distribución homogénea de animales con alta y baja respuesta de escape.

Los protocolos de entrenamiento utilizados en este capítulo fueron de tipo **espaciado** y **masivo** conformados por 15 y 300 ensayos respectivamente. En ambos casos la duración total del entrenamiento fue de 5 minutos de adaptación al actómetro y 45 minutos de estimulación. Para mas detalle del diseño del entrenamiento ver "Materiales y métodos generales" (Capítulo II). Inmediatamente después del entrenamiento los animales eran retirados del actómetro y alojados en recipientes individuales hasta la sesión de evaluación. En la sesión de evaluación todos los animales eran colocados en el actómetro, dejados 5 minutos para la adaptación y luego todos los grupos, entrenados y no entrenados recibían seis ensayos presentados con la misma frecuencia con la cual fueron presentados durante el entrenamiento.

Las inyecciones fueron realizadas a distintos tiempos respecto del entrenamiento y de la evaluación de acuerdo a lo indicado en el experimento. El tiempo requerido para inyectar un animal es de aproximadamente 15 segundos.

### **3.2.3 Evaluación de la retención y del efecto amnésico**

Para el análisis de un posible efecto de la droga durante el entrenamiento, en el caso de inyecciones pre-entrenamiento, se realizó un ANOVA de medidas repetidas de la respuesta de escape durante el entrenamiento para animales inyectados con solución salina y con droga.

La evaluación de la memoria de largo término se basó en la respuesta de escape durante la sesión de evaluación, por comparación entre la respuesta de los animales entrenados y la de los animales que solo habían permanecido en el contexto sin ser entrenados. Se consideró que había retención de la respuesta aprendida, cuando se obtenían respuestas de escape estadísticamente mas bajas en los animales entrenados que en los no entrenados. El análisis estadístico se basó en tres comparaciones planeadas

basados en un ANOVA de medias pesadas con  $\alpha = 0,05$ , de acuerdo al siguiente esquema:

	<b>Comparaciones Planeadas</b>	<b>EFECTO</b>
<b>1</b>	<b><i>CTX – Sal vs ENT - Sal</i></b>	<b><i>Prueba del efecto del entrenamiento</i></b>
<b>2</b>	<b><i>CTX – Sal vs CTX - Inh</i></b>	<b><i>Prueba de posibles efectos inespecíficos de la droga sobre la respuesta de escape</i></b>
<b>3</b>	<b><i>CTX – Inh vs ENT- Inh</i></b>	<b><i>Prueba el efecto AMNÉSICO del Inhibidor de PKA</i></b>

1. La respuesta de escape del grupo **ENT-Sal** debe ser significativamente menor que la del grupo **CTX-Sal** para comprobar que existe retención de la respuesta aprendida, de acuerdo con lo esperado para un protocolo de entrenamiento fuerte. Para el objetivo de los experimentos en este capítulo es condición que se cumpla dicha diferencia.
2. Diferencias significativas entre la respuesta de escape de los animales sin entrenamiento con distintas inyecciones (**CTX-Sal vs CTX-Inh**) revela un efecto inespecífico de la droga. Si esta comparación muestra diferencias significativas, entonces invalida el experimento, el hecho de que diferencias en el escape están dadas por la droga en si y no por el efecto de la droga sobre el aprendizaje.
3. La ausencia de diferencias significativas entre la respuesta de escape de los animales **CTX-Inh** y **ENT-Inh** revela ausencia de retención y por lo tanto el efecto amnésico de la droga, siempre y cuando se cumplan las condiciones planteadas para las comparaciones anteriores 1 y 2. Las diferencias significativas en la comparación 3 indican que la droga a la dosis utilizada no posee efecto sobre la memoria.

El análisis fue realizado para cada uno de los ensayos de la sesión de evaluación. Sin embargo la interpretación de los efectos del entrenamiento espaciado fue centrada en el primer ensayo de la sesión de evaluación que es el ensayo que distintivamente evidencia a la memoria contexto-señal (**MCS**).

En contraposición el análisis de la memoria señal (**MS**) se basó exclusivamente en el análisis del denominado bloque de re-entrenamiento, bloque que comprende del ensayo 2 al 6 de la sesión de evaluación.

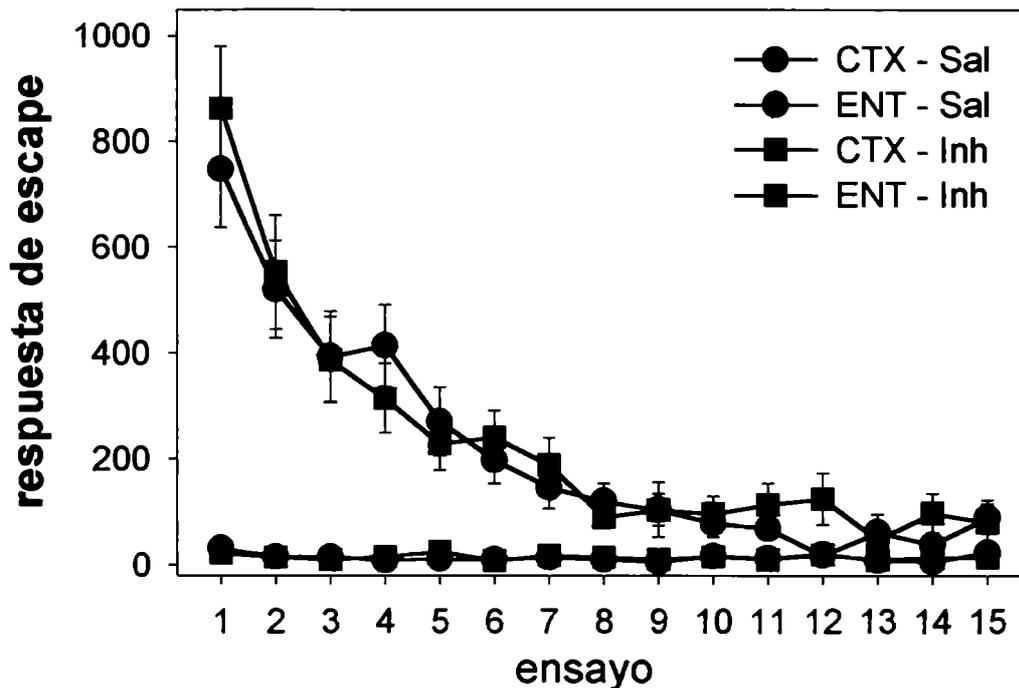
## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 La inhibición de PKA durante el entrenamiento disrumpe el proceso de consolidación de la memoria contexto-señal**

Previamente se ha reportado (Romano et al., 1996 b) que el inhibidor de PKA Rp-8CI-cAMPS a una dosis de 0,5  $\mu$ gr por animal muestra efecto amnésico cuando es administrado inmediatamente antes o después de un entrenamiento espaciado. Sin embargo, en sucesivas repeticiones de este experimento la administración del inhibidor en forma posterior al entrenamiento mostró no tener un efecto amnésico sólido como el observado para la administración previa al entrenamiento. La inhibición de PKA posterior al entrenamiento mostró efectos amnésicos erráticos incluso a pesar de haber elevado la dosis del inhibidor al doble y la cuádruple de la utilizada normalmente (0.5 ; 1 y 2  $\mu$ gr/animal). Estas diferencias entre los efectos de la administración previa y la posterior al entrenamiento llevaron a pensar que PKA cumpliría un papel muy temprano en el proceso de formación de la memoria, ya sea en la etapa de adquisición del aprendizaje o en la inducción del proceso de consolidación.

Con el objetivo de esclarecer esta hipótesis se realizó una serie de experimentos con inyecciones del inhibidor de PKA muy cercanas al momento de entrenamiento manteniendo la dosis utilizada del inhibidor a 2  $\mu$ gr/animal.

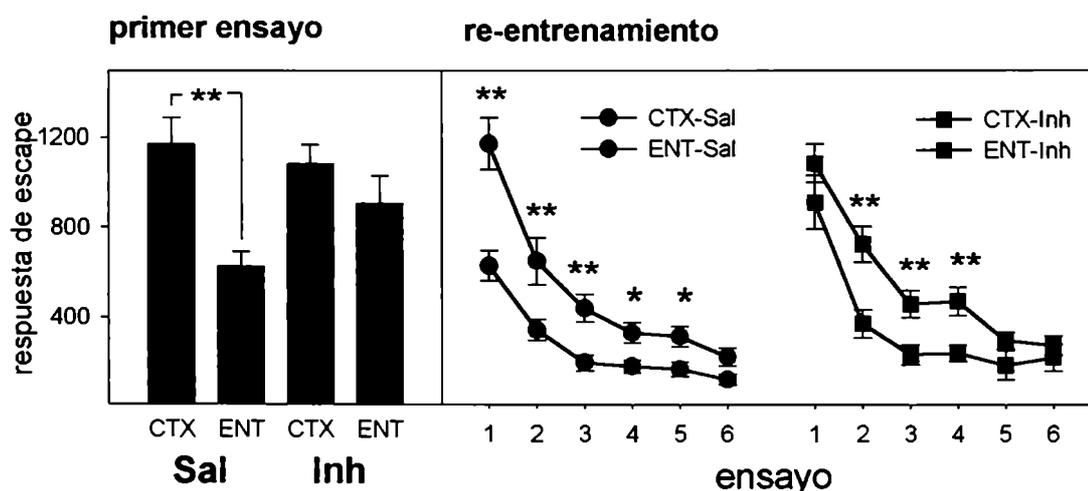
En un primer experimento se inyectó el inhibidor de PKA inmediatamente antes del entrenamiento espaciado. Se registró la curva de entrenamiento para animales inyectados con solución salina y para animales inyectados con droga. Simultáneamente se registró también la actividad basal o exploratoria de los animales que permanecieron en el contexto sin ser estimulados. En la figura 3.2 se puede observar el nivel de actividad y la respuesta de escape para los cuatro grupos.



**Figura 3.2 Sesión de Entrenamiento.** 15 minutos antes del entrenamiento los animales fueron inyectados con solución salina o inhibidor de PKA. El gráfico representa la media y ES de la respuesta de escape (rojo) o actividad exploratoria (verde) de 33 animales en cada grupo durante la sesión de entrenamiento. El inhibidor de PKA no afectó la respuesta de escape, la adquisición de la respuesta habituada ni la actividad exploratoria.

ANOVAs de medidas repetidas 2 x 15 entre los grupos inyectados con droga y solución salina, no muestra diferencias significativas en la respuesta de escape o actividad exploratoria. El entrenamiento sí demostró efecto significativo a lo largo de los ensayos:  $F_{14, 532} = 26,6$   $p < 0.01$ . Estos resultados indican que la inhibición de PKA durante el entrenamiento no interfiere la adquisición del aprendizaje.

La retención a largo término fue evaluada en estos mismos animales 24 horas después del entrenamiento. La figura 3.3 muestra la respuesta de escape en los seis ensayos de la sesión de evaluación y resalta en detalle el primer ensayo que mejor evidencia la memoria contexto-señal inducida por un entrenamiento espaciado.



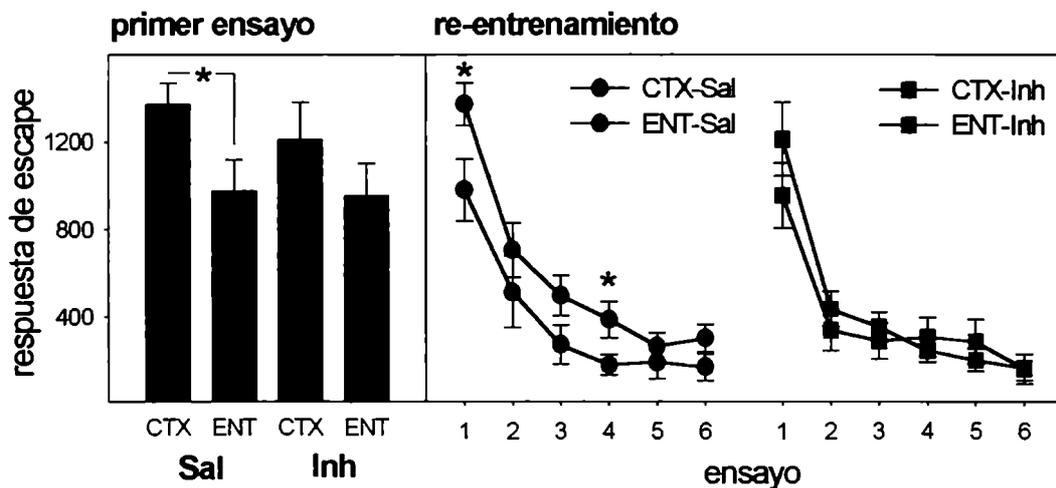
**Figura 3.3 Sesión de Evaluación, Inhibición de PKA Pre-entrenamiento.**

15 minutos antes del entrenamiento los animales fueron inyectados con solución salina o inhibidor de PKA. Los gráficos representan la media y ES de la respuesta de escape durante la sesión de evaluación de la memoria de largo término (n = 33). \* p < 0.05 y \*\* p < 0.01.

De acuerdo con lo esperado, comparaciones planeadas del primer ensayo en la evaluación de la memoria de largo término muestran una reducción significativa de la respuesta de escape de los animales entrenados y que recibieron inyección de solución salina respecto de los animales no entrenados ( $F_{1, 128} = 13,23$  p < 0,01 ) y un efecto amnésico del inhibidor de PKA como lo muestra la falta de diferencias entre los animales entrenados y no entrenados inyectados con el inhibidor de PKA. La extensión del análisis al resto de los ensayos muestra diferencias significativas en el segundo ( $F_{1, 128} = 5,37$  p < 0,05) y tercer ensayo ( $F_{1, 128} = 6,28$  p < 0,05) entre los grupos inyectados con solución salina. Los contrastes para el resto de la evaluación entre los grupos inyectados con inhibidor, contrariamente a la amnesia observada para el primer ensayo, sí revelan retención en el segundo ( $F_{1, 128} = 7,38$  p < 0,01), tercer ( $F_{1, 128} = 18,25$  p < 0,01), cuarto ( $F_{1, 128} = 11,22$  p < 0,01) y quinto ensayo ( $F_{1, 128} = 5,87$  p <

# Diferencias de escape entre los grupos entrenados y no entrenados inyectados

con solución salina que se encuentran en el límite de la significancia. Las comparaciones planeadas muestran una reducción significativa de la respuesta del grupo entrenado en el primer ( $F_{1,96} = 3,89$   $p < 0,05$ ) y en el cuarto ensayo ( $F_{1,96} = 4,26$   $p < 0,05$ ). La administración del inhibidor de PKA inmediatamente después del ensayo 12 mostró un completo efecto amnésico evidenciado por la falta de diferencias significativas entre los animales entrenados y no entrenados. No se observaron tampoco diferencias entre los animales no entrenados inyectados con distintas soluciones. Estos resultados indican que inmediatamente después de 12 ensayos el proceso de consolidación es aún lábil a la inhibición de PKA.



**Figura 3.5 Inhibición de PKA luego de 12 ensayos de entrenamiento.** El entrenamiento fue reducido a 12 ensayos e inmediatamente después los animales recibieron inyección de solución salina o inhibidor de PKA. Los gráficos muestran la respuesta de escape (media ± ES) durante la sesión de evaluación de la memoria de largo término para cada grupo de animales (n= 25). \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

En su conjunto, los resultados de esta sección sugieren que la activación de PKA es un evento temprano de la consolidación y que el efecto de su inhibición se evidencia recién en la memoria de largo término.

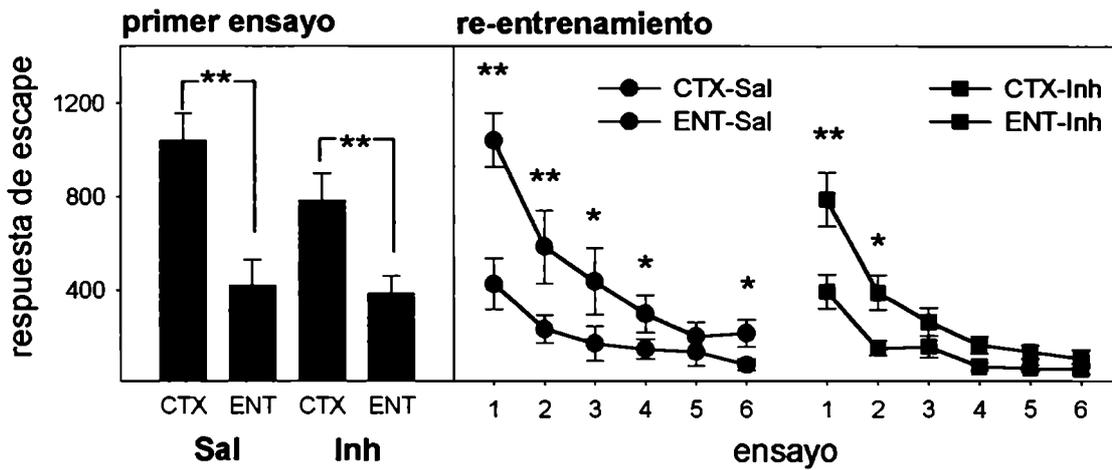
### 3.3.2 Existe un segundo periodo posterior al entrenamiento en el cual la memoria es sensible a la inhibición de PKA

Un hallazgo recurrente en el estudio de los mecanismos que subyacen la memoria, es que cambios y requerimientos bioquímicos observados durante etapas muy temprana o inmediatas al entrenamiento se reiteran horas después en etapas tardías del proceso de formación de memoria.

Estos antecedentes, basados en diferentes modelos y paradigmas han mostrado, en el periodo de consolidación, segundas ventanas de dependencia de la síntesis proteica (Grecksch & Matthies, 1980; Freeman et al., 1995), de la glicosilación de proteínas (Scholey et al., 1993) y de la activación de PKA (Bernabeu et al., 1997, Bourtchouladze et al., 1998). Estos antecedentes provienen de investigaciones realizadas en modelos de vertebrados.

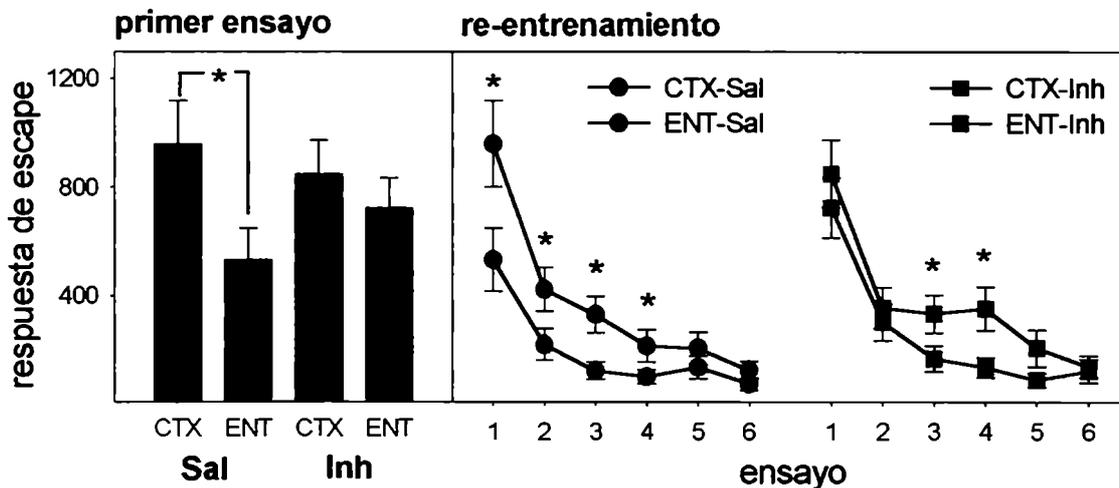
A pesar de los resultados de la sección anterior que demuestran que la activación de PKA en la formación de la memoria contexto-señal del cangrejo *Chasmagnathus* tiene un papel muy temprano en el proceso y restringido al tiempo del entrenamiento, el objetivo de la siguiente serie de experimentos fue evaluar el posible papel de PKA en etapas posteriores o tardías del proceso de consolidación.

En un primer experimento se inyectó el inhibidor de PKA (2  $\mu$ gr/animal) dos horas después de finalizado el entrenamiento espaciado de 15 ensayos. La respuesta de escape durante la sesión de evaluación se muestra en el gráfico 3.6. Comparaciones planeadas del primer ensayo de la evaluación revelan diferencias significativas entre animales entrenados y no entrenados inyectados con solución salina (  $F_{1, 116} = 17,12$   $p < 0,01$  ) o inyectados con droga (  $F_{1, 116} = 7,01$   $p < 0,01$  ). Estos resultados revelan el efecto propio del entrenamiento de 15 ensayos espaciados y la ausencia de efecto amnésico por la inyección del inhibidor 2 horas después del entrenamiento. La extensión del análisis a los ensayos de la fase de re-entrenamiento muestran diferencias entre los grupos inyectados con salina en el segundo (  $F_{1, 116} = 7,02$   $p < 0,01$  ), tercer (  $F_{1, 116} = 4,47$   $p < 0,05$  ), cuarto (  $F_{1, 116} = 4,48$   $p < 0,05$  ) y sexto ensayo (  $F_{1, 116} = 4,19$   $p < 0,05$  ) y para los grupos inyectados con inhibidor en el segundo ensayo (  $F_{1, 116} = 4,21$   $p < 0,05$  ).



**Figura 3.6 Inhibición de PKA 2hs post-entrenamiento.** 2hs después de un entrenamiento espaciado de 15 ensayos los animales recibieron inyección de solución salina o inhibidor de PKA. Los gráficos muestran la respuesta de escape (media ± ES) durante la sesión de evaluación de la memoria de largo término para cada grupo de animales (n= 30). \* p < 0.05 y \*\* p < 0.01.

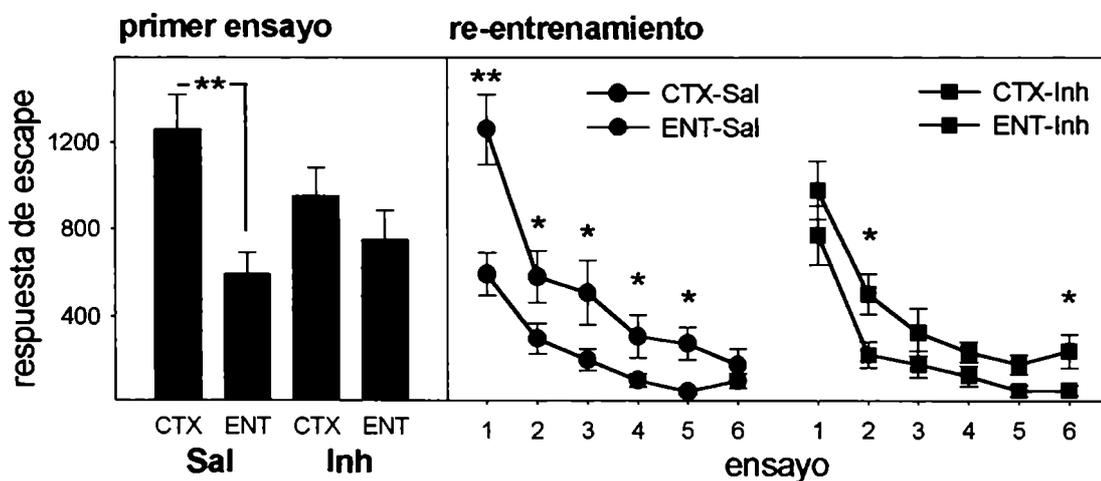
En un siguiente experimento la inyección de Rp-8Cl-cAMPS fue realizada 4 horas después de finalizado el entrenamiento de 15 ensayos espaciados. La sesión de evaluación se muestra en la figura 3.7.



**Figura 3.7 Inhibición de PKA 4hs post-entrenamiento.** 4hs después de un entrenamiento espaciado de 15 ensayos los animales recibieron inyección de solución salina o inhibidor de PKA. Los gráficos muestran la respuesta de escape (media ± ES) durante la sesión de evaluación de la memoria de largo término para cada grupo de animales (n= 32). \* p < 0.05 y \*\* p < 0.01.

Como lo revela el análisis del primer ensayo, una clara diferencia fue observada entre los animales entrenados y no entrenados inyectados con solución salina ( $F_{1,124} = 5,41$   $p < 0,05$ ), y no se observa esta diferencia entre los animales entrenados y no entrenados que fueron inyectados con el inhibidor de PKA. Comparaciones planeadas entre los animales no entrenados inyectados con solución salina o con droga no muestran efecto del inhibidor sobre la respuesta de escape, indicando que el efecto de la droga en los animales entrenados se trata de un efecto amnésico. Este efecto amnésico no se observa en la fase de re-entrenamiento. Comparaciones planeadas muestran retención en los animales entrenados inyectados con solución salina también en el segundo ( $F_{1,124} = 5,41$   $p < 0,05$ ), tercer ( $F_{1,124} = 6,53$   $p < 0,05$ ), y cuarto ensayo ( $F_{1,124} = 3,93$   $p < 0,05$ ), bloque de re-entrenamiento ( $F_{1,116} = 4,97$   $p < 0,05$ ) y en los inyectados con droga en el tercer ( $F_{1,116} = 4,23$   $p < 0,05$ ), y cuarto ensayo ( $F_{1,116} = 5,69$   $p < 0,05$ ), bloque de re-entrenamiento ( $F_{1,116} = 3,86$   $p < 0,05$ ).

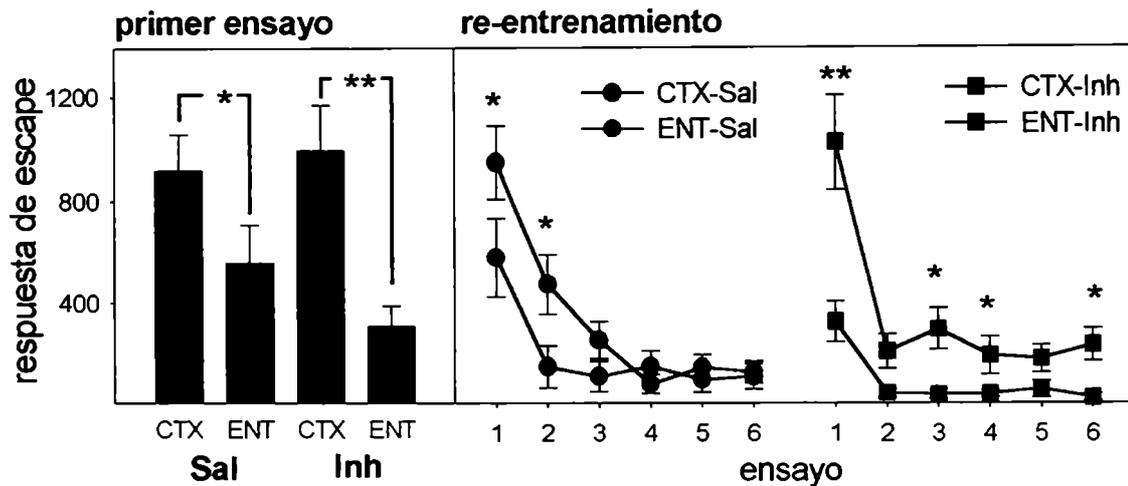
En el siguiente experimento la inhibición de PKA se desplazó a 8 horas después del entrenamiento. En la figura 3.8 se muestra la respuesta de escape durante la sesión de evaluación.



**Figura 3.8 Inhibición de PKA 8hs post-entrenamiento.** 8hs después de un entrenamiento espaciado de 15 ensayos los animales recibieron inyección de solución salina o inhibidor de PKA. Los gráficos muestran la respuesta de escape (media ± ES) durante la sesión de evaluación de la memoria de largo término para cada grupo de animales (n= 32). \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

Comparaciones planeadas del primer ensayo entre los grupos inyectados con solución salina muestran una alta retención en los animales entrenados ( $F_{1,124} = 12,64$   $p < 0,05$ ) y contrariamente no se observan diferencias entre los grupos inyectados con inhibidor de PKA. Si bien la respuesta de escape de los animales no entrenados inyectados con droga es menor a la de los animales inyectados con solución salina estas diferencias no son significativas. De manera similar a la administración de la droga 4 horas después del entrenamiento, la inhibición de PKA 8 horas después del entrenamiento posee efecto amnésico. En la fase de re-entrenamiento se observan diferencias significativas entre los animales inyectados con solución salina para el segundo ( $F_{1,124} = 5,15$   $p < 0,05$ ), tercer ( $F_{1,124} = 4,80$   $p < 0,05$ ), cuarto ( $F_{1,124} = 5,42$   $p < 0,05$ ) y quinto ensayo ( $F_{1,124} = 11,42$   $p < 0,01$ ) y bloque de re-entrenamiento ( $F_{1,124} = 6,84$   $p < 0,01$ ). Las diferencias inducidas por el entrenamiento entre animales inyectados con el inhibidor de PKA se observan en el segundo ( $F_{1,124} = 4,83$   $p < 0,05$ ), y sexto ensayo ( $F_{1,124} = 4,82$   $p < 0,05$ ) y resulta significativamente menor el bloque de re-entrenamiento en su conjunto ( $F_{1,124} = 3,86$   $p < 0,05$ ).

En el siguiente experimento la inyección del inhibidor de PKA se realizó a las 12 horas después de finalizado el entrenamiento. Cuando se realizó este experimento de acuerdo al diseño de los anteriores, respetando el intervalo entre sesiones de 24 horas, se observó que el inhibidor de PKA provocaba una reducción significativa de la respuesta de escape en los animales no entrenados. Este efecto fue considerado como un efecto inespecífico de la droga que se evidencia alrededor de las 12 horas después de la administración. Este efecto no ocurre inmediatamente después de la administración como se observó en el experimento de inyección previa al entrenamiento, ni tampoco cuando el intervalo entre la inyección y la evaluación es mayor a 12 horas, de acuerdo a lo observado en los experimentos anteriores. Aprovechando que la memoria contexto-señal muestra una buena retención hasta al menos 5 días después del entrenamiento (Hermitte et al., 1999), se repitió el experimento administrando la inyección del inhibidor 12 horas después del entrenamiento pero prolongando el intervalo entre sesiones a 48 horas.

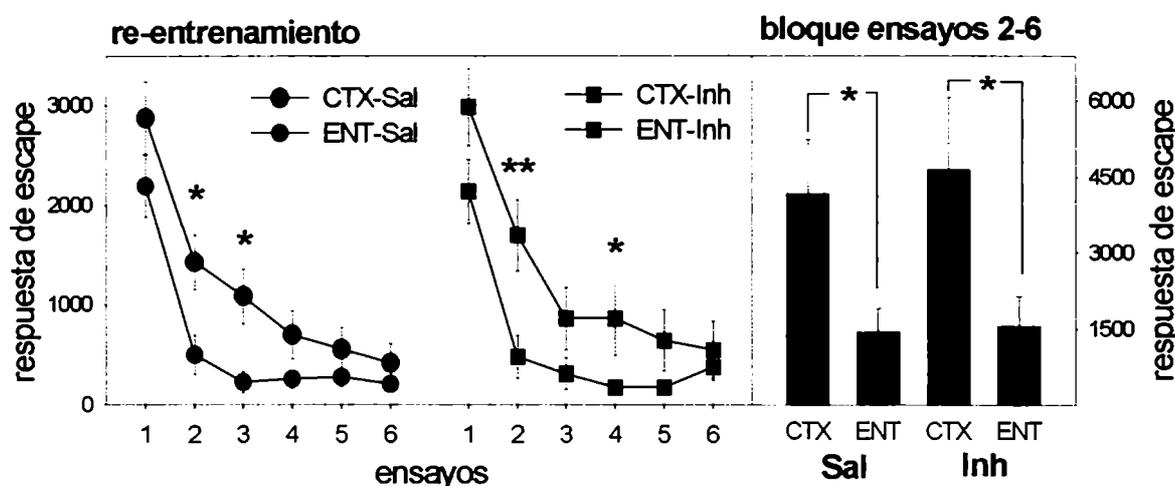


**Figura 3.9 Inhibición de PKA 12hs post-entrenamiento.** 12hs después de un entrenamiento espaciado de 15 ensayos los animales recibieron inyección de solución salina o inhibidor de PKA. Los gráficos muestran la respuesta de escape para cada grupo (media  $\pm$  ES) durante la sesión de evaluación de la memoria de largo término 48 hs después del entrenamiento (n= 20). \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$

De acuerdo a lo esperado para un entrenamiento de 15 ensayos espaciados, los animales entrenados e inyectados con solución salina mostraron una buena retención en la sesión de evaluación para el primer ( $F_{1,97} = 5,57$   $p < 0,05$ ) y segundo ensayo ( $F_{1,97} = 3,77$   $p < 0,05$ ). Doce horas después del entrenamiento la inhibición de PKA no mostró efecto amnésico como lo evidencian las diferencias significativas obtenidas entre animales entrenados y no entrenados inyectados con el inhibidor de PKA. Una buena retención de la respuesta aprendida fue obtenida para el primer ( $F_{1,97} = 16,53$   $p < 0,01$ ), segundo ( $F_{1,97} = 8,05$   $p < 0,05$ ), tercer ( $F_{1,97} = 8,63$   $p < 0,05$ ) y sexto ensayo ( $F_{1,97} = 6,84$   $p < 0,05$ ), bloque de re-entrenamiento ( $F_{1,97} = 6,99$   $p < 0,05$ ).

Los experimentos en esta segunda sección de experimentos muestran la existencia de un segundo período durante la consolidación de la memoria contexto-señal en el cual el inhibidor de PKA posee efecto amnésico. Este efecto se evidenció en una amplia ventana entre las 4 y 8 horas después del entrenamiento.

300 ensayos que es sabido que induce una buena retención de la memoria señal (**MS**) al menos por 3 días después del entrenamiento (Hermitte et al., 1999). Este protocolo tiene, al igual que el espaciado, una duración total de 45 minutos. Dado el interés de comparar mecanísticamente a la memoria señal de la memoria contexto señal, el inhibidor de PKA (2  $\mu$ gr/animal) se administró inmediatamente antes del entrenamiento, que de acuerdo a los resultados anteriores resulta crítico para la formación de la memoria contexto-señal.



**Figura 3.11 Inhibición de PKA durante un entrenamiento masivo 15 min.** antes de un entrenamiento masivo los animales recibieron inyección de solución salina o inhibidor de PKA. Los gráficos muestran la respuesta de escape durante la sesión de evaluación para cada grupo (media  $\pm$  ES) (n= 40). \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$

Los resultados mostrados en la figura 3.11 muestran la respuesta de escape durante toda la sesión de evaluación y el análisis detallado del bloque de re-entrenamiento, fase de la evaluación que mejor evidencia la memoria señal. De acuerdo con lo esperado para un entrenamiento masivo no se observan diferencias en la respuesta de escape del primer ensayo y sí se observa retención en la fase de re-entrenamiento para el grupo de animales entrenados e inyectados con solución salina. Comparaciones planeadas muestran diferencias significativas en el segundo ( $F_{1,156} = 5,93$   $p < 0,05$ ), tercer ensayo ( $F_{1,156} = 7,10$   $p < 0,01$ ) y para el bloque de re-entrenamiento ( $F_{1,156} = 4,14$   $p < 0,05$ ) entre los animales inyectados con solución salina. La comparación entre

animales inyectados con el inhibidor de PKA muestra también diferencias significativas en la fase de re-entrenamiento, en el segundo ( $F_{1,156} = 9,98$   $p < 0,01$ ), cuarto ensayo ( $F_{1,156} = 4,64$   $p < 0,05$ ) y bloque de re-entrenamiento ( $F_{1,155} = 5,29$   $p < 0,05$ ). Las comparaciones planeadas no mostraron diferencias entre los animales no entrenados inyectados con solución salina o con inhibidor.

Estos resultados indican que la administración de 2  $\mu\text{gr}/\text{animal}$  del inhibidor de PKA no tiene efecto amnésico para la memoria señal en las condiciones en que sí lo demostró para la memoria de tipo contexto señal. No debemos descartar posibles diferencias mecanísticas en la participación de PKA en la formación de la memoria señal para las cuales resulte insuficiente la dosis utilizada. Sería necesario evaluar dosis más altas del inhibidor y probar otros tiempos de administración para descartar definitivamente un papel de PKA en la formación de la memoria señal.

### 3.4 Discusión

Previo al inicio de esta tesis existían antecedentes provenientes de nuestro laboratorio que demostraban que la vía de transducción de AMPc-PKA participa en la formación de la memoria contexto-señal en el cangrejo *Chasmagnathus* (Romano et al., 1996 a,b). Sin embargo, en esos trabajos la administración del inhibidor de PKA había sido restringida a tiempos cercanos al entrenamiento. Los experimentos en este capítulo constituyen un estudio detallado y sistemático de los requerimientos de PKA durante las distintas etapas de la memoria. Mediante una estrategia farmacológica reversible se ha inhibido PKA durante distintos períodos comprendidos desde la adquisición hasta la evocación de la memoria y se ha determinado la existencia de al menos dos períodos críticos de dependencia de la actividad de PKA durante el proceso de consolidación de la memoria contexto-señal. Por otro lado se han obtenido evidencias que sugieren que la activación de PKA no es una característica común de todos los procesos mnésicos.

### **3.4.1 Curso temporal de la acción de PKA durante la consolidación**

#### **3.4.1.1 PKA durante la adquisición**

La primera sección de experimentos en este capítulo indica la existencia de un periodo de dependencia de PKA para la formación de la memoria de largo término restringido a una ventana temporal que coincide con el entrenamiento. La respuesta de escape inicial durante el entrenamiento no fue afectada por la inhibición de PKA, lo que permite descartar que el efecto amnésico se deba a un deterioro de las habilidades sensoriales o motoras del animal. Por otro lado el descenso de la respuesta de escape entre ensayos durante la sesión de entrenamiento no mostró diferencias entre animales inyectados con solución salina o con inhibidor de PKA, lo que indica que la actividad de PKA no estaría involucrada en la adquisición del aprendizaje.

La inhibición de PKA durante el entrenamiento, posee un efecto amnésico que se evidencia recién en la sesión de evaluación de la memoria de largo término, lo que permite concluir que la activación de PKA posee un papel temprano y de expresión tardía en la memoria contexto-señal.

La inyección del inhibidor de PKA inmediatamente posterior al entrenamiento solo resultó amnésica cuando el entrenamiento se redujo en tiempo y número de ensayos, de 15 a 12 ensayos, sugiriendo que la actividad de PKA durante los primeros 40 minutos desde el inicio del entrenamiento, es la necesaria y suficiente para esa etapa de la consolidación.

En el modelo de memoria contexto-señal del cangrejo *Chasmagnathus* existe un punto de inflexión entre los 10 y 15 ensayos del entrenamiento, de modo tal que 10 ensayos resultan insuficientes para inducir una memoria que perdure al menos por 24 horas y en cambio 15 ensayos provocan una buena retención que perdura al menos por 5 días (Hermitte et al., 1999). En una muy estrecha correlación con estos hallazgos, se ha observado también la existencia de dicho punto de inflexión a nivel molecular, ya que 15 o mas ensayos pero no 10 o menos, inducen la activación del factor de transcripción NF-kB en cerebro de *Chasmagnathus* (Freudenthal & Romano, 2000), activación que constituye un requerimiento fundamental para la formación de la memoria de largo término

(Merlo et al., 2002). Estas observaciones a nivel comportamental y molecular sugieren que la inducción del proceso de consolidación es de tipo "todo o nada" dependiendo de un número umbral de ensayos entre 10 y 15.

De acuerdo con los antecedentes (Romano et al, 1996b), sabemos que con un protocolo de entrenamiento débil, el proceso de consolidación es facilitado por la activación farmacológica de PKA. De dicha observación podemos concluir, que al menos uno de los factores que determinan la debilidad de un protocolo de pocos ensayos, es una actividad insuficiente de PKA. Estos resultados, sumados a los presentes que muestran que la inhibición de PKA posee efecto amnésico después de 12 ensayos y no de 15, indican que el punto de inflexión que existe entre 10 y 15 ensayos, estaría también relacionado con el nivel alcanzado de actividad de PKA. Un número mínimo de ensayos es indispensable para alcanzar el nivel de actividad de PKA necesario en el proceso de consolidación. Una vez alcanzada la actividad umbral de PKA, por ejemplo después de 15 ensayos, la inhibición de la misma ya no posee efecto. Esto indica que la acción de PKA en el proceso de consolidación es anterior y no posterior al momento de haber alcanzado dicho umbral. De acuerdo a esta interpretación, el factor que vincula el número de ensayos con una actividad umbral de PKA, es la acumulación de un o varios substratos fosforilados por PKA y no el nivel de activación de PKA en si mismo.

En otras palabras, los resultados indican que la inhibición de PKA después de 15 ensayos no posee efecto amnésico porque los substratos de PKA que deben ser fosforilados como parte del inicio del proceso de consolidación ya fueron fosforilados y en cambio dicha situación no es alcanzada en el entrenamiento de 12 ensayos. Sin embargo, si después de doce ensayos PKA no es inhibida el protocolo de entrenamiento sí resulta el suficiente para el proceso de consolidación. Esto indica que después del ensayo 12 existe un actividad persistente de PKA necesaria para el proceso de consolidación .

El número de ensayos umbral para alcanzar la activación necesaria de PKA e inducir el proceso de consolidación podría variar entre individuos, épocas del año, etc.. ,posibilidad que resulta muy probable por el hecho de trabajar con poblaciones naturales sometidas a variaciones ambientales y estacionales no controladas. Esta consideración provee una explicación al hecho de que en

algunos casos sí se haya observado efecto amnésico cuando la inyección era administrada después de 15 ensayos (Romano et al., 1996b).

Sobre la base de los resultados con inhibición de PKA próxima al entrenamiento podemos concluir que, en la formación de la memoria contexto-señal en *Chasmagnathus*, la activación de PKA no es necesaria para la adquisición del aprendizaje, pero si resulta fundamental durante este período para el inicio del proceso de consolidación.

Estos resultados concuerdan con algunos aspectos y difieren con otros respecto de los hallazgos en otros modelos y paradigmas de aprendizaje. En el modelo de facilitación pre-sináptica que subyace la sensibilización en *Aplysia* se ha demostrado que la activación temprana de PKA es fundamental en el proceso de formación de la facilitación de largo término. Sin embargo, en contraste con los hallazgos en *Chasmagnathus*, el requerimiento de la activación de PKA se extiende de manera continua por 10 horas aún después de la inducción (Hegde et al., 1997). También en contraste con *Chasmagnathus*, se ha demostrado en *Aplysia* que la actividad de PKA es fundamental también para la adquisición y para la expresión de la facilitación de corto término (Kandel & Schwartz, 1982).

La existencia de una ventana de acción de PKA cercana al entrenamiento que es fundamental en la consolidación de la memoria de largo término ha sido probada también en mamíferos (Bernabeu et al., 1997 y Bourtchouladze et al., 1998). A diferencia con los experimentos en cangrejo, en estos trabajos no se practicó la administración del inhibidor de PKA antes del entrenamiento sino inmediatamente después y en dichos casos y en contraste con lo observado en cangrejo fue reportado un efecto amnésico de la inhibición post-entrenamiento. Cabe resaltar que el tipo de entrenamiento utilizado en esos casos tiene una duración de segundos a pocos minutos, mientras que el entrenamiento en cangrejo tiene una duración de 45 minutos. Estas diferencias sugieren que en los reportes en mamíferos la acción de PKA involucrada en la formación de memoria tomaría lugar en los minutos posteriores a la experiencia que provocó el aprendizaje, mientras en cangrejo la acción de PKA ocurriría durante el transcurso del entrenamiento.

### 3.4.1.2 Segundo período de activación de PKA

El hallazgo de un segundo periodo de acción de PKA durante una etapa tardía de la consolidación ha sido reportado previamente en mamíferos, para distintas especies y distintos paradigmas de aprendizaje. En ratas, la formación de memoria de largo término de una tarea de evitación pasiva ha demostrado depender de la activación de PKA en hipocampo en una ventana temporal entre 3 y 6 horas (Bernabeu et al., 1997). En correlación con estos requerimientos se ha encontrado aumento de la actividad de PKA y de la activación del factor de transcripción CREB durante estos períodos. En ratones, se ha encontrado también la existencia de dos periodos críticos para la formación de la memoria de un condicionamiento aversivo, en los cuales los requerimientos de PKA coinciden además con la dependencia de la síntesis proteica (Bourtchouladze et al., 1998).

En este capítulo se ha demostrado también la existencia de un segundo período de activación de PKA durante la consolidación de la memoria contexto-señal en *Chasmagnathus*. La inhibición de PKA posee efecto amnésico también entre 4 y 8 horas después del entrenamiento.

Durante la consolidación de la memoria contexto-señal en cangrejo se han encontrado también dos fases de activación del factor de transcripción Rel/Nf-kB (Freudenthal & Romano, 2000) que coinciden con los períodos de acción de PKA. La relación entre PKA y NF-kB ya fue reportada en otros sistemas (Shirakawa et al., 1989; Shirakawa & Mizel, 1989; Zhong et al., 1998) y la posible vinculación entre estas vías y el proceso de formación de memoria está siendo estudiada en cangrejo.

### 3.4.1.3 La evocación es independiente de PKA

El hecho de que la administración del inhibidor de PKA 15 minutos antes de la evaluación no mostró efecto sobre la memoria contexto-señal sugiere que la acción de PKA estaría específicamente involucrada en la consolidación de la memoria y no en el proceso de evocación.

Estos resultados coinciden con lo observado para la evocación de la memoria de largo término en el modelo de facilitación pre-sináptica en *Aplysia*. En dicho

modelo se ha demostrado que 10 horas después de la inducción de la facilitación, la evocación es independiente de la actividad de PKA (Hegde et al., 1997; Chain et al., 1999), fenómeno que estaría directamente relacionado con la evocación a partir de una marca mnésica estable.

En ratas sin embargo, se ha demostrado que el nivel de activación de PKA en hipocampo durante la sesión de evaluación posee efecto sobre la evocación, ya que la previa administración a la evaluación del inhibidor o activador de PKA tiene efecto amnésico o facilitador respectivamente (Szapiro et al., 2000).

### **3.4.2 La activación de PKA no es un requerimiento común de todos los procesos mnésicos en *Chasmagnathus***

Como ha sido previamente considerado, la presentación masiva de los estímulos en el paradigma de *Chasmagnathus* induce la formación de una memoria distinta a la memoria contexto-señal y de naturaleza no asociativa. Esta memoria señal, de duración intermedia, se diferencia también en base los mecanismos que la subyacen ya que no es afectada por las drogas que sí inducen amnesia de la memoria contexto-señal, como ser cicloheximida (Hermitte et al., 1999) o scopolamina (Berón de Astrada & Maldonado, 1999). La activación del factor de transcripción Rel/NF-kB es inducida por el entrenamiento espaciado pero no por el entrenamiento masivo (Freudenthal et al., 1998; Freudenthal & Romano, 2000), sugiriendo que la participación de este factor transcripción y posiblemente de toda la maquinaria de expresión no sea requerida para la retención de la memoria señal.

En el último experimento de este capítulo, el inhibidor de PKA no indujo amnesia de la memoria señal cuando fue administrado en la dosis y momento en que sí resulta amnésico para la memoria contexto-señal. Este resultado sugiere que la vía de transducción de AMPc no está involucrada en la formación de la memoria señal.

Si embargo, cabe la posibilidad de que la consolidación de este tipo de memoria posea períodos de labilidad distintos a los de la memoria contexto-señal. Aún ante dicha posibilidad, estos resultados permiten diferenciar

mecanicamente ambos procesos de consolidación, y establecer que los requerimientos y mecanismos bioquímicos de la instalación de una y otra forma de memoria divergen.

### **3.4.3 Disección de la memoria contexto-señal y la memoria señal**

Una característica fundamental de la memoria señal es que no se manifiesta desde el primer ensayo de la evaluación sino en la fase de re-entrenamiento dado que el primer ensayo es necesario como recordatorio para su evocación (Pedreira et al., 1998). En contraste, en la memoria contexto-señal, la sola presentación del contexto sirve de recordatorio y el animal muestra retención desde el primer ensayo.

Se ha demostrado que una buena retención de la memoria señal se induce con un entrenamiento de tipo masivo y compuesto por un gran numero de ensayo (300 aprox.). La memoria contexto-señal en cambio es inducida por un entrenamiento espaciado.

Sin embargo, se ha propuesto que el entrenamiento espaciado induce la formación de los dos tipos de memoria y que ambos se expresan en forma conjunta durante la evocación, contribuyendo la componente de memoria contexto-señal a la evocación durante la totalidad de los ensayos de la evaluación y la memoria señal solo durante la fase de re-entrenamiento (Maldonado et al., 1997; Maldonado et al., 2001).

Valiéndose de agentes amnésicos específicos para uno u otro tipo de memoria, es posible disecar ambas componentes de la memoria a partir de la retención inducida por un entrenamiento espaciado.

En el último experimento de este capítulo se demostró que la inhibición de PKA no interfiere con la memoria señal y en los experimentos anteriores se puede observar que el efecto amnésico sobre la memoria contexto-señal estuvo restringido al primer ensayo. La retención de la respuesta aprendida durante la fase de re-entrenamiento no se vió afectada. Este hecho sugiere que el efecto amnésico de la inhibición de PKA sobre la memoria inducida por un

entrenamiento espaciado interfiere específicamente con la consolidación de la componente contexto-señal de la memoria y que la evocación remanente observada durante la fase de re-entrenamiento es producto de la memoria señal independiente de PKA. Este hecho constituye una prueba mas de que la retención 24 horas después del entrenamiento espaciado esta compuesta por componentes asociativas y no asociativas que se expresan conjuntamente y basadas en mecanismos celulares distintos.

# **Capítulo IV**

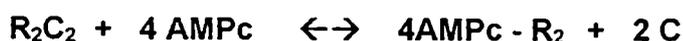
**Proteína Quinasa dependiente de AMP cíclico  
en sistema nervioso de *Chasmagnathus*.**

**Medición de su activación**



## 4.1 Introducción

Luego de que la proteína quinasa dependiente de AMPc fuera identificada en músculo esquelético (Walsh et al., 1968), e hígado de mamíferos (Langan, 1968), la existencia de esta enzima fue también probada en diversos tejidos y modelos animales evolutivamente distantes y postulada como un mediador universal de los efectos fisiológicos de AMPc (Kuo & Greengard, 1969). Se comprobó luego que el mecanismo de activación de esta enzima consiste en la disociación de subunidades regulatorias y subunidades catalíticas (Tao et al., 1970; Gill & Garren, 1970; Kumon et al., 1970; Brostrom et al., 1971). Como fue presentado en la introducción de esta tesis, hoy en día se sabe que en ausencia de AMPc, PKA es una holoenzima tetramérica enzimáticamente inactiva que consiste en dos subunidades catalíticas y un dímero regulatorio. El AMPc se une cooperativamente a dos sitios en cada una de las subunidades regulatorias reduciendo entre 4 y 5 órdenes la afinidad entre subunidades. Esto induce la separación de un dímero regulatorio pegado a 4 moléculas de AMPc y dos subunidades catalíticas activas (Beebe & Corbin, 1986).



El descenso de la concentración de AMPc en la célula induce la rápida reasociación de la holoenzima.

Las subunidades se encuentran usualmente presentes en cantidades equimolares (Hofmann et al., 1977) por lo que de acuerdo a la ecuación anterior, PKA puede ser encontrada en la célula en dos estados, inactiva como holoenzima o disociada como complejos  $4\text{AMPc} - R_2$  y subunidades catalíticas activas. La actividad de PKA en una célula o tejido surge entonces de la cantidad total de PKA presente y de su estado asociado-disociado.

La rapidez de la reacción de disociación y reasociación de la holoenzima de PKA proporciona una dificultad cuando se quiere medir *in vitro* el grado de activación endógeno de la enzima. Los procedimientos de extracción y reacción deben ser tales que preserven el equilibrio endógeno o de lo contrario la actividad medida será un artefacto de la manipulación del extracto (Palmer et al., 1980).

Los antecedentes acerca del efecto de activadores e inhibidores de PKA sobre el comportamiento en cangrejo (Romano et al., 1996 a, b) y los resultados del capítulo III, sugieren un papel fundamental de la vía de transducción de AMPc y PKA en procesos de plasticidad neuronal en cangrejo, como ha sido demostrado para otras líneas filogenéticamente distantes. La ausencia de información previa acerca de esta vía de transducción en sistema nervioso de crustáceos en general, motivó los objetivos de este capítulo, en el cual se estudió la distribución de PKA en el sistema nervioso de *Chasmagnathus*, el nivel de actividad en distintas estructuras nerviosas, la activación con posibles moduladores endógenos de su actividad y se establecieron las condiciones para medir cambios en el grado de activación de PKA inducidos por estimulación.

## **4.2 Materiales y métodos**

Los experimentos presentados en este capítulo muestran en pocos casos metodologías o procedimientos comunes ya que en su mayoría se trata de la búsqueda de métodos que resulten eficientes para evidenciar variaciones en los niveles de activación endógena de PKA. Por lo tanto a continuación se hace mención de las generalidades y los detalles serán especificados en la sección de resultados.

### **4.2.1 Preparación de tejidos y extractos**

En todos los casos se utilizaron animales naive. Previo a la disección los animales eran enfriados durante 2 minutos en agua salobre en equilibrio con hielo.

Dependiendo del experimento, una vez disecados los tejidos de interés estos fueron procesados de distinta manera según lo indicado:

- a) homogenizados y los extractos crudos utilizados inmediatamente;
- b) inmediatamente congelado el tejido entero en nitrógeno hasta su utilización;
- c) incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego tratados como en a) o en b).

Excepto que se indique, la solución de homogenización estándar fue: 5mM EDTA, 2 mM EGTA, 50mM TRIS pH 7.5 e inhibidores de proteasas: 1µgr/ml Pepstatin A, 10µgr/ml Leupeptin, 0.25mM PMSF, 10µgr/ml Aprotinin, y el homogenizador utilizado fue de tipo vidrio-vidrio.

En los experimentos en los que se midió la concentración de proteínas en los extractos, se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) y sero-albumina bovina como estándar.

#### **4.2.2 Ensayo de proteína quinasa**

En todos los experimentos se utilizó el heptapeptido "Kemptide" (Leu, Arg, Arg, Ala, Ser, Leu, Gly), como sustrato específico de PKA aceptor de  $^{32}\text{P}$  y el inhibidor específico de PKA, PKI(6-22)amida, para determinar la actividad de quinasas no correspondiente a PKA. (Kemptide y PKI fueron obtenidos de Sigma)

Las condiciones de reacción variaron entre experimentos y serán especificadas en cada caso.

Para revelar la actividad fosfotransferasa se utilizaron dos métodos. Uno de ellos basado en la fijación del sustrato peptídico a papeles de fosfocelulosa (Roskoski, 1983). Brevemente, una vez cumplido el tiempo de reacción, el producto era rápidamente sembrado en papeles de fosfocelulosa (Wahntman P-81) de 2 x 2 cm. El sustrato peptídico se adhiere por carga al papel y el fosfato no incorporado se lava por inmersión y agitación suave durante 2 horas del papel en ácido fosfórico 1%. El papel es luego secado, colocado en viales con líquido centellador (Tolueno, POP, Popop) y el  $^{32}\text{P}$  retenido en el papel es cuantificado en un contador de

centelleo. El segundo método utilizado fue: una vez cumplido el tiempo de fosforilación *in vitro*, la reacción era detenida con solución desnaturizante (5% SDS, 5% mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.5M TRIS pH 6.8) y el producto corrido en un gel de poliacrilamida 25% para resolver péptidos del tamaño del Kemptide. El gel era luego secado y expuesto en películas X-Omat AR5 Kodak. En los casos en que fue cuantificada la actividad a partir de la autoradiografía, la imagen de las placas fue recogida con un "Scanner" transmisor, U-Max Powerlook III, y la densidad de las bandas medida con el programa Scion-Image.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Medición de actividad PKA en *Chasmagnathus*

El objetivo principal de este capítulo fue desarrollar un método que permitiera en primer lugar cuantificar específicamente la actividad total de PKA y el grado de activación endógena de esta enzima en tejido nervioso de *Chasmagnathus*. En segundo término, desarrollar un método que permitiera evaluar cambios transitorios en el grado de activación de PKA producto de la estimulación.

Con este propósito se eligió un ensayo de fosforilación *in vitro* de un sustrato exógeno para evitar la interferencia que puede provocar el grado previo de fosforilación *in situ* de los sustratos endógenos cuando estos son utilizados como testigos de la actividad enzimática. Se utilizó como sustrato el heptapeptido "Kemptide" el cual es un sustrato muy afín y específico de PKA (Kemp et al., 1977). A lo largo de este capítulo y de los restantes se midió la incorporación de fosfato al Kemptide en diversas condiciones de reacción.

Las reacciones fueron realizadas sin AMPc para conocer el grado de activación endógeno de la enzima, también denominado en esta tesis como actividad basal de PKA, y con agregado de AMPc saturante (10  $\mu$ M) para conocer la actividad total de PKA en un tejido.

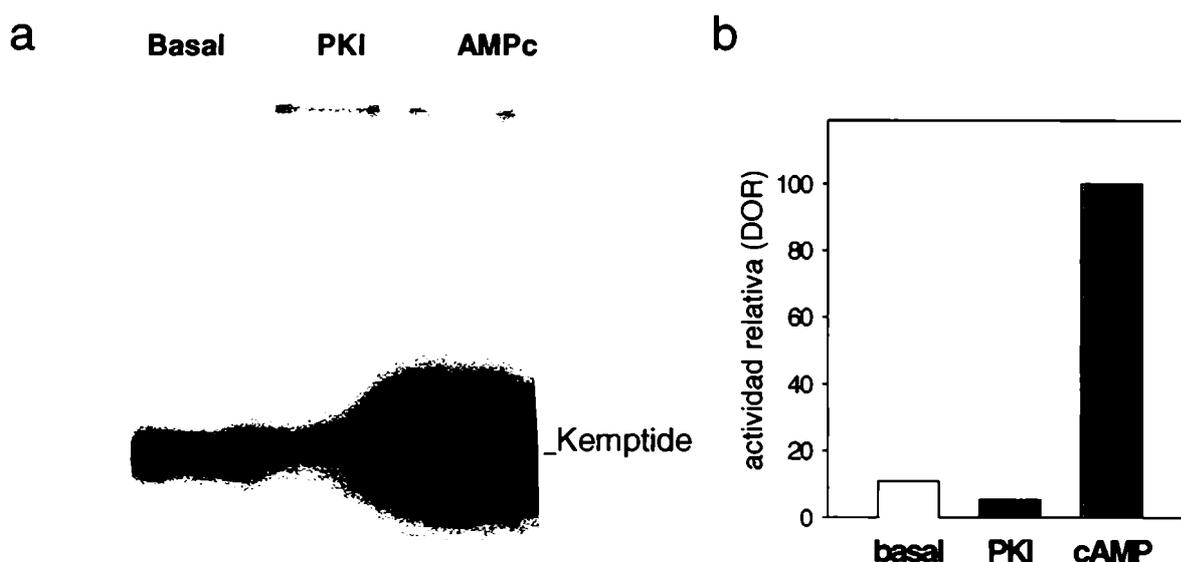
Las reacciones de fosforilación fueron en su mayoría iniciadas a los pocos segundos de obtener los extractos, a fin de evitar la disociación o reasociación de PKA *in vitro* y de ese modo revelar el grado de activación endógena. Con este objetivo no se realizaron pasos adicionales de purificación de la enzima, por lo que resultó indispensable calcular la componente específica de PKA del total de actividad quinasa medida en cada ensayo, restando la actividad fosfotransferasa de otras quinasas presentes en el mismo extracto. Para esto, se midió la actividad de quinasa en las mismas condiciones pero con el agregado del inhibidor específico de PKA, PKI (6-22) amida (Walsh et al., 1971), el cual permite conocer la actividad correspondiente a otras quinasas. La actividad medida con agregado de PKI nunca superó el 10% de la actividad total medida en cada tejido y la actividad remanente en presencia de PKI resultaba semejante si era en presencia o ausencia de AMPc. Este resultado comprueba también la especificidad del aumento en la actividad inducido por AMPc. El efecto de PKI en la reacción resultó comparable al de realizar la reacción de fosforilación sin el substrato Kemptide, lo que prueba la especificidad de las condiciones del ensayo, del substrato y del inhibidor por PKA.

Se establecieron condiciones de reacción tales que la actividad medida era proporcional al tiempo de reacción y a la cantidad de proteínas en la muestra que contenía la enzima.

Fueron practicados distintos métodos de revelado de la actividad fosfotransferasa o quinasa. Para hacer un análisis cuantitativo de la actividad fosfotransferasa, el resultado de las reacciones de fosforilación *in vitro* fue revelado mediante el método de fijación del producto en papel de fosfocelulosa (Roskoski, 1983) y medido en contador de centelleo. La actividad específica de PKA medida en las condiciones de trabajo resultó comparable a la reportada en otros modelos animales (hipocampo de ratas: actividad basal - total de PKA: 0.33 - 2.43 pmol/min/ $\mu$ g; en Roberson & Sweatt, 1996). La actividad basal de PKA en extractos nervioso de *Chasmagnathus*, calculada como la actividad medida sin AMPc menos la actividad medida con agregado de PKI, fue de 0.2 a 0.4 pmol/min/ $\mu$ gr dependiendo del tejido nervioso. La actividad total, medida con 10 $\mu$ M

de AMPc menos la actividad en presencia de PKI, fue de 1.5 a 3 pmol/min/ $\mu$ gr también dependiendo del tejido. La relación entre la actividad basal y actividad total en animales sin tratamiento alguno fue de aproximadamente fue aproximadamente 1:6 tomando el ganglio supraesofágico entero, pero este coeficiente varía notablemente entre tejidos como se verá en las próximas secciones.

Con el objeto de confirmar la especificidad del método, el producto de las reacciones fue también revelado por separación en un gel de poliacrilamida y expuesto para autoradiografía. La figura 4.1 muestra una autoradiografía y la cuantificación del producto de reacción en condición basal, inhibido con PKI y estimulado con 10  $\mu$ M AMPc. Una calle paralela en la que se corrió solo 2  $\mu$ gr de Kemptido y que fue teñida con azul de coomassie, permitió identificar que la principal banda revelada pertenece al substrato exógeno, Kemptide (Figura 4.1).



**Figura 4.1: Fosforilación *in vitro* del substrato específico de PKA, Kemptide.** a) el producto de fosforilación fue separado en un gel desnaturizante de poliacrilamida y expuesto para autoradiografía. La actividad de PKA en extractos de ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus* fue evaluada en condiciones: basal, como el grado de activación endógena propia de los extractos; inhibida con 2  $\mu$ M del inhibidor de PKA, PKI; y estimulada con 10  $\mu$ M de AMPc. b) Cuantificación por densitometría de las banda en a.

### 4.3.2 PKA en sistema nervioso de *Chasmagnathus*

Una vez determinadas las condiciones para la medición de actividad de PKA en *Chasmagnathus*, el primer objetivo fue estudiar la distribución de PKA en el sistema nervioso. El sistema nervioso fue disecado y las principales estructuras y neuropilos separados para determinar la actividad total y actividad basal de PKA en cada uno de ellos. Dada la pequeña masa de las estructuras nerviosas, fue necesario reunir tejido de varios animales para tener una cantidad crítica de muestra. Las muestras fueron colectadas en tubos en nitrógeno líquido hasta tener el material correspondiente a 10 medulas externas, 10 medulas internas, 10 protocerebros lateral, 8 protocerebros medial, 8 deutocerebros, 8 tritocerebros, 20 lóbulos olfatorios y 2 ganglios torácicos (ver Capítulo I, Sistema Nervioso en Decápodos). Una vez reunido el material, este fue descongelado y homogenizado en 200  $\mu$ l de la solución de homogenización.

Diez  $\mu$ gr de cada muestra fueron preincubados 5 minutos en un volumen de 30  $\mu$ l en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M AMPc o 2  $\mu$ M PKI. La reacción se inició con 10  $\mu$ l de solución de reacción preparada para obtener una concentración final en un volumen de reacción de 40  $\mu$ l, de 50 $\mu$ M Kemptide, 10mM  $MgCl_2$ , 50mM TRIS pH 7.5 y 100 $\mu$ M ATP, 1 $\mu$ Ci ( $\gamma$ - $^{32}P$ )ATP. La reacción de fosforilación duró 5 minutos a temperatura ambiente y fue detenida sembrando 20  $\mu$ l del producto en papeles de fosfocelulosa.

La tabla 4.1 muestra la media y error estándar de 5 repeticiones independientes del experimento en los que se midió en cada estructura: **actividad total de PKA**, calculada como la actividad medida en presencia de AMPc 10  $\mu$ M menos la medida en presencia PKI 2  $\mu$ M; y **nivel de activación endógena** o **actividad basal**, calculado como la actividad obtenida sin agregado de AMPc menos la actividad medida con PKI 2  $\mu$ M.

Tejido	Actividad relativa de PKA	
	actividad basal	actividad total
Medula Externa	20.76 ± 2.07	129.02 <sup>a</sup> ± 11.99
Médula Interna	18.35 ± 4.11	106.82 <sup>a</sup> ± 11.23
Protocerebro Lateral	21.36 ± 3.37	119.62 <sup>a</sup> ± 8.04
Protocerebro Medial	11.13 <sup>b</sup> ± 2.17	74.77 <sup>b</sup> ± 6.15
Lóbulo olfatorio	27.2 <sup>a</sup> ± 3.91	76.48 <sup>b</sup> ± 7.77
Deuto y Tritocerebro	11.99 <sup>b</sup> ± 2.57	55.03 <sup>b</sup> ± 3.79
Ganglio Torácico	8.86 <sup>b</sup> ± 1.23	70.29 <sup>b</sup> ± 4.88

**Tabla 4.1: Actividad de PKA en neuropilos y ganglios nerviosos de *Chasmagnathus*.** Los valores mostrados corresponden a la media y error estándar de 5 experimentos independientes. La fosforilación fue realizada en tres condiciones: actividad basal, actividad total (10 $\mu$ M AMPc) y en presencia del inhibidor PKI 2 $\mu$ M. La actividad en presencia de PKI fue restada a la actividad basal y total. La actividad relativa fue calculada dividiendo la actividad obtenida para el tejido por la actividad total promedio de todos los tejidos y multiplicado por 100. Diferentes letras indican diferencias significativas en una prueba de Duncan  $p < 0.05$ .

El análisis de la actividad endógena o basal de PKA mostró ser significativamente mayor en los lóbulos olfatorios en comparación con la actividad registrada en protocerebro medial, deuto y tritocerebro y ganglio torácico. Los neuropilos del pedúnculo ocular: medula externa, interna y protocerebro lateral mostraron un nivel intermedio de actividad basal de PKA. La actividad total de PKA medida con agregado de AMPc en la reacción de modo tal de estimular la totalidad de la enzima, reveló que la cantidad total de PKA en los neuropilos ubicados en los pedúnculos ópticos es significativamente mayor que lo neuropilos en el ganglio supraesofágico o torácico.

En resumen, estos resultados muestran que existe una distribución diferencial de PKA en distintas estructuras del sistema nervioso de *Chasmagnathus* y que no existe una relación fija entre actividad total y basal de PKA. La actividad de PKA en el lóbulo olfatorio resulta el ejemplo más evidente de ello, ya que muestra el grado de activación endógena mayor y una de las actividades totales más bajas. Las posibles explicaciones para estas diferencias entre tejidos, puede darse en términos de diferentes grados de activación, expresión diferencial de las subunidades catalíticas y regulatorias que modifican el equilibrio de la ecuación de disociación y asociación de PKA, diferentes concentraciones de AMPc en las distintas estructuras, expresión de distintas isoformas de PKA con distintos umbrales de activación, etc.

### **4.3.3 Medición de la activación de PKA**

En la sección anterior quedó en evidencia que existen tejidos con diferentes grados de actividad endógena de PKA. Asumiendo que esos tejidos provenían de animales sin tratamiento alguno previo a la disección, podría considerarse a la activación endógena medida como los niveles basales de actividad de PKA, propios y característicos del tejido en ausencia de estimulación. El siguiente objetivo de este capítulo fue establecer las condiciones para medir variaciones en el nivel basal de activación de PKA producto de la estimulación.

#### **4.3.3.1 Congelamiento de la muestra y revelado por autoradiografía**

Como primer acercamiento y con el propósito de reducir las posibles especulaciones que proporciona la administración de drogas *in vivo*, tales como la llegada de la droga al tejido blanco, la concentración efectiva en hemolinfa y otros aspectos farmacocinéticos, se optó inicialmente por disecar el tejido de interés e incubarlo en una solución conteniendo drogas que de acuerdo a la bibliografía y antecedentes en otros modelos inducen la activación de PKA.

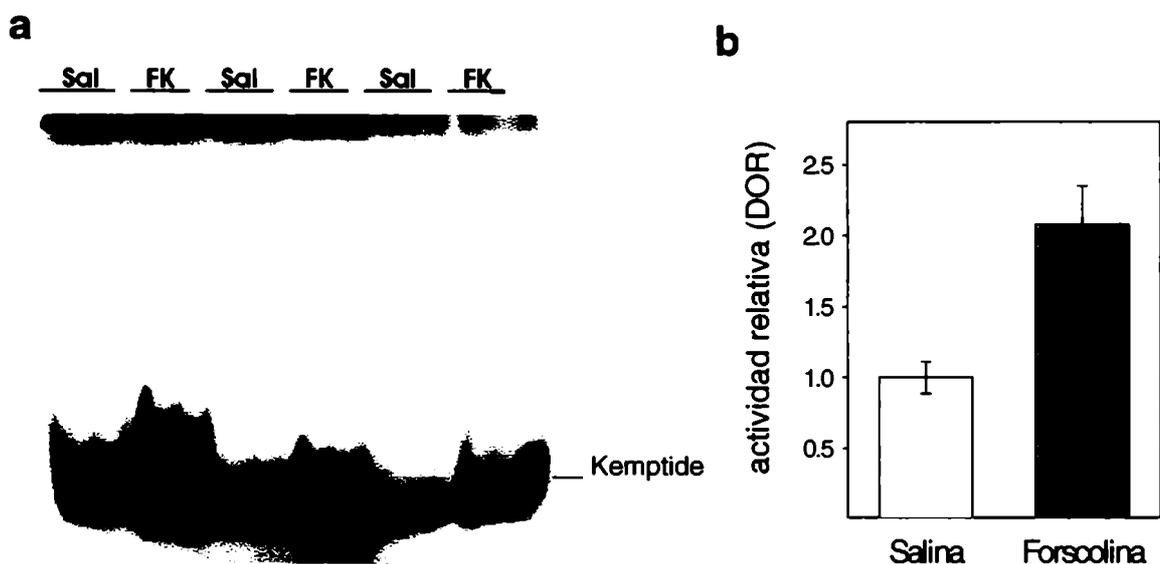
El procedimiento completo de estimulación consistió en disecar el ganglio supraesofágico, remover el tejido conectivo que lo cubre para permitir la penetración de las soluciones de incubación y luego incubarlo durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución HEPES 10mM pH 7.5 y salina p/crustáceos, con o sin agregado de droga.

El tratamiento del tejido a continuación de la incubación así como el procedimiento para la reacción de fosforilación y el revelado, fueron realizados de acuerdo al método de ensayo de fosforilación rápida implementada por Müller y colaboradores (Hildebrandt & Müller, 1995 a, 1995 b; Müller & Carew, 1998; Müller, 2000). Dicha metodología fue diseñada con el objeto de reducir al máximo los tiempos de preparación de los extractos y de reacción a fin de evidenciar el estado endógeno de activación inducido por una estimulación y evitar artefactos de asociación o disociación de PKA *in vitro*. Esta metodología, con leves modificaciones respecto de lo implementado por Müller, consistió en extraer el ganglio de la incubación e inmediatamente colocarlo en el fondo de un tubo tipo "Eppendorf" que flotaba en la superficie de un recipiente con nitrógeno líquido. Esto provoca el congelamiento instantáneo del tejido. Mediante un embolo de vidrio previamente enfriado en nitrógeno líquido y que calza en el tubo, el ganglio era triturado dentro del mismo tubo sin ser retirado del nitrógeno para evitar el descongelamiento. El tubo era cerrado y guardado en nitrógeno líquido hasta la utilización de la muestra.

Para la reacción de fosforilación el tubo conteniendo la muestra era retirado del nitrógeno líquido, se esperaba que el tubo tomara la temperatura ambiente y la muestra era descongelada directamente descargando 30  $\mu$ l de solución de reacción dentro del tubo (5mM EDTA, 2mM EGTA, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 25 $\mu$ M Kemptide, 10 $\mu$ M ATP, 10mM 2-mercaptoetanol, 50mM TRIS pH 7.5 y 3 $\mu$ Ci ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP. Durante 30 segundos de reacción, el contenido del tubo era mezclado cargándolo y descargándolo continuamente en la punta de una pipeta y luego detenido con 5 $\mu$ l de solución desnaturizante de siembra y cargado en un gel de poliacrilamida.

El argumento que justifica este procedimiento es que el equilibrio alcanzado en el tejido entero entre las formas asociada y disociada de la enzima es detenido al ser congelado el tejido instantáneamente en nitrógeno líquido y que dicho estado no se ve alterado hasta el momento mismo de la reacción, que dura un tiempo lo suficientemente corto para minimizar los efectos de asociación o disociación de la holoenzima.

La eficacia de este método para determinar cambios en el grado de activación endógena de PKA, se probó inicialmente luego de una incubación de 15 minutos del ganglio supraesofágico en 10 $\mu$ M de forskolina, activador de la enzima adenilato ciclasa.



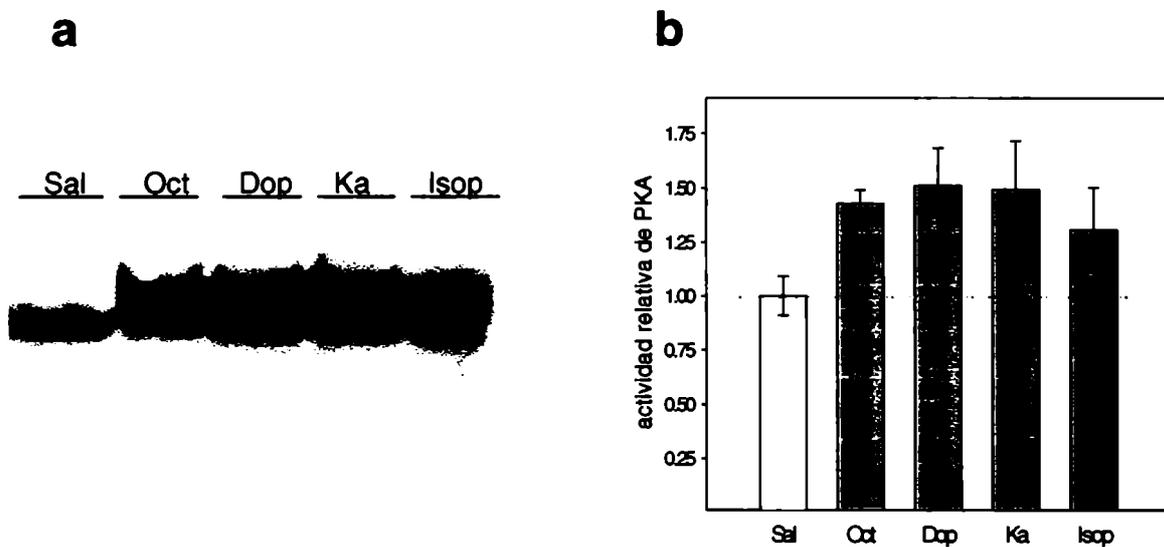
**Figura 4.2: Determinación de la activación de PKA por forskolina.**

Ganglios supraesofágicos fueron incubados en solución Salina (Sal) o Forscolina (FK) 10 $\mu$ M durante 15 min y luego se midió la actividad basal de PKA. a) Autoradiografía del producto de fosforilación *in vitro*. b) Media y error estándar de la cuantificación por densitometría de las banda en a).

La figura 4.2 muestra una autoradiografía del producto de fosforilación. La intensidad de las bandas permite hacer un análisis cualitativo de la activación de PKA luego de la incubación en solución salina y forskolina 10 $\mu$ M y evidencia en

una mayor incorporación de fosfato al Kemptido en los extractos provenientes de ganglios incubados en forscolina como lo muestra la densitometría.

Una vez probada la eficiencia del método para evidenciar la activación de PKA por estimulación se procedió de la misma manera pero esta vez incubando con neurotransmisores y agonistas de receptores. Se incubaron ganglios en 10  $\mu$ M de Octopamina, Dopamina, Kainato (agonista glutamatérgico), Isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) o solución salina.



#### Figura 4.3: Activación de PKA por Neurotransmisores y Agonistas

a. Autoradiografía representativa del producto de fosforilación *in vitro* del Kemptide luego de incubación de ganglios supraesofágicos 15 minutos en Salina, Octopamina, Dopamina, Kainato e Isoproterenol ( 10 $\mu$ M ). Condiciones de reacción para medición de actividad basal de PKA.

b. La intensidad de las bandas fue cuantificada por densitometría y normalizada al control. Cada barra representa la media y error estándar de experimentos independientes.

La figura 4.3 muestra una autoradiografía representativa del producto de fosforilación y la incorporación de fosfato al Kemptide luego de la incubación del tejido en las diferentes drogas. La figura 3 b muestra medias y error estándar de 4

réplicas independientes de este experimento. Aunque el número de repeticiones no permita hacer un análisis estadístico estricto se pueden observar las tendencias del aumento de la actividad de PKA en todos los casos de incubación con las drogas probadas en comparación con los controles.

#### **4.3.3.2 Medición de la activación en papel de fosfocelulosa**

El método de congelamiento rápido de la muestra demostró revelar la activación de PKA producto de estimulación. Sin embargo este método resulta también limitado por distintos aspectos: a) la muestra es completamente usada para una única determinación de actividad, que puede ser la actividad basal, la actividad total estimulada con AMPc o la actividad de quinasas inespecíficas que se miden inhibiendo PKA con PKI; b) el método de trituración del tejido congelado resulta difícil de estandarizar y no permite cuantificar la concentración proteica en el extracto. Ambas limitaciones impiden normalizar la actividad medida a la eficacia de la extracción y substraer la actividad que corresponde a otras quinasas. Además se pierde la posibilidad de obtener un doble dato que caracteriza la actividad de PKA de la muestra, la actividad basal y actividad total. Estos factores agregan un grado adicional de dispersión a los datos que solo se solucionaría aumentando el número de réplicas.

A continuación se practicaron métodos que permitieran a partir de una muestra obtener los datos de actividad de PKA basal, total e inespecífica y cuantificar la cantidad de proteínas utilizadas en el ensayo. Para esto es necesario partir de un extracto homogéneo que provea de alícuotas idénticas y representativas para los diferentes ensayos, para lo cual resulta inevitable un paso de homogenización estandarizado y en particular en este caso, que el procedimiento además no afecte el grado de activación logrado *in situ*. La base para la búsqueda de este método fue combinar la máxima reducción posible de los tiempos con condiciones de homogenización y reacción que inhibieran la reasociación o disociación de la holoenzima de PKA. Los parámetros considerados con este propósito fueron, ajustar los volúmenes de homogenización y reacción, la concentración de NaCl y

la incorporación de factores tales como inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidores de fosfatasa entre otros de acuerdo a Roberson & Sweatt (1996).

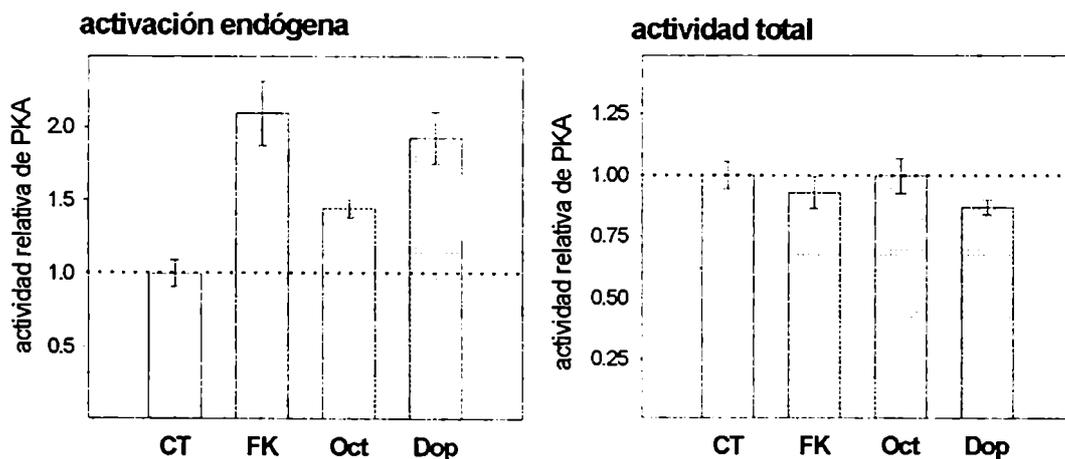
Es sabido que la concentración de NaCl afecta directamente la afinidad entre las subunidades regulatorias y catalíticas de PKA (Corbin et al., 1973, 1975). Esta característica fue aprovechada para impedir la reasociación de la enzima activa. Para esto fue necesario ajustar una concentración de NaCl que preserve el equilibrio endógeno inhibiendo la reasociación de las subunidades ya disociadas, pero que a su vez no provoque la disociación de la fracción no activa de enzima. Durante el ajuste de esta condición en cangrejo, se observó que el exceso de NaCl no solo favorece la disociación de la holoenzima sino también tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad total de la misma (datos no mostrados). Estos efectos se observaron cuando la concentración de NaCl superaba de 150mM y en cambio nunca se observaron para concentraciones por debajo de 100 mM. Dado que el efecto de disociación inducido por NaCl es mayor a temperatura ambiente que a 0°C (Corbin et al., 1975), se optó en el ensayo utilizado para cangrejo por realizar la homogenización de los tejidos con 100mM de NaCl, paso que es realizado a 0 °C, y luego dicha concentración era reducida a 1/3 en la reacción de fosforilación, que es realizada a temperatura ambiente.

Los volúmenes de homogenización y reacción también resultan críticos, ya que determinan la concentración final de proteínas y del AMPc endógeno en la muestra, y ambos consisten en factores que influye sobre el equilibrio de asociación y disociación de la enzima (Palmer et al., 1980).

Para la calibración de las condiciones mencionadas se utilizaron los mismos activadores que ya evidenciaron aumentar la actividad basal de PKA en la sección anterior. Se incubaron ganglios supraesofágicos en 10µM de forskolina, Octopamina, Dopamina y solución salina durante 15 minutos.

El protocolo resultante del ajuste de las variables que optimizaron las diferencias de actividad entre ganglios estimulados y control fue: un ganglio supraesofágico entero homogenizado en un homogenizador vidrio-vidrio en 150µl de solución de homogenización a 0°C que contiene 2mM 2-mercaptoetanol, 0.01% Triton X100,

2mM EGTA, 5mM EDTA, 50mM TRIS pH 7.5, 100mM NaCl, inhibidor de fosfatasas: 2 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ; inhibidor de fosfodiesterasa 100 $\mu\text{M}$  IBMX; inhibidores de proteasas: 1 $\mu\text{gr/ml}$  Pepstatin A, 10 $\mu\text{gr/ml}$  Leupeptin, 0.25mM PMSF, 10 $\mu\text{gr/ml}$  Aprotinin. Inmediatamente, 10 $\mu\text{l}$  del homogenato eran cargados en un tubo que ya contenía 20 $\mu\text{l}$  de la solución de reacción a temperatura ambiente para lograr una concentración final en 30  $\mu\text{l}$  de reacción de: 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 $\mu\text{M}$  ATP, 100 $\mu\text{M}$  Kemptide, 2mM EGTA, 5mM EDTA, 50mM Tris pH 7.5 , 1/3 del resto de componentes de la solución de homogenización, 1  $\mu\text{Ci}$  ( $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ )ATP y conteniendo 10 $\mu\text{M}$  AMP o 2 $\mu\text{M}$  PKI o en ausencia de ambos. La reacción duraba 1.5 minutos a temperatura ambiente y era detenida sembrando 20  $\mu\text{l}$  de la reacción sobre papel de fosfocelulosa. La cuantificación de la actividad de PKA en estas condiciones se muestra en la figura 4.4.



**Figura 4.4. Actividad basal y total de PKA** en ganglios supraesofágicos de *Chasmagnathus* incubados 15 min en solución salina (CT), Forscolina (FK), Octopamina (Oct) y Dopamina (Dop) 10 $\mu\text{M}$ . La actividad PKA fue medida en forma basal, estimulada con AMPc e inhibida con PKI. La actividad remanente en presencia del inhibidor fue restada de la actividad basal y total. La actividad relativa de PKA esta expresada normalizada al control y representa media y error estandar de 4 experimentos independientes.

Los resultados muestran aumento en la actividad basal de PKA sin modificaciones de los niveles totales de actividad, lo que resulta consistente con un aumento de la

actividad mediado por AMPc. La incubación en Forscolina y Dopamina muestran un aumento de aproximadamente el 100 % de la actividad basal y la incubación con Octopamina aproximadamente un 50 % de aumento.

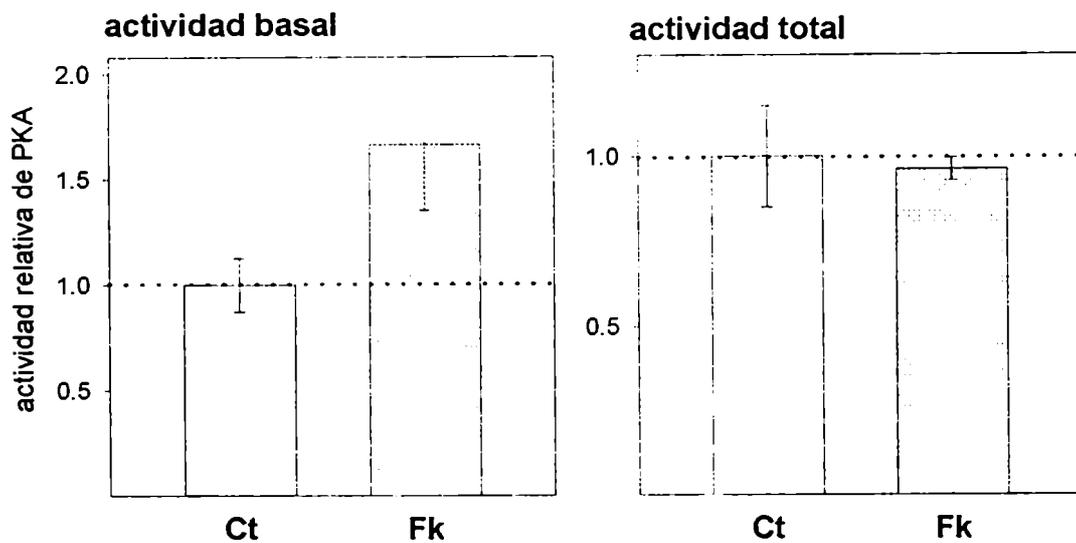
#### **4.3.3.3 Medición de activación *in vivo***

El método anteriormente descrito resultó eficiente para determinar la actividad basal, el grado de activación y la actividad total de PKA en una muestra. El siguiente objetivo fue probar dicha metodología para probar el grado de activación de PKA pero luego de una estimulación en condiciones *in vivo* ya que el propósito último de esta serie de experimentos fue obtener un procedimiento que permitiera describir la actividad de PKA luego de una sesión de entrenamiento.

Con este objetivo fueron tomados animales naive que recibieron de acuerdo al mismo protocolo de inyección que el capítulo III, inyecciones de solución salina o de forskolina. Considerando una dilución de aproximadamente 100 veces de la droga en hemolinfa, se administró una dosis de Forscolina de 50 $\mu$ l a concentración de 1mM. 10 minutos después de las inyecciones los animales fueron enfriados durante 2 minutos en agua salobre a 0°C, inmediatamente se practicó la disección del ganglio supraesofágico y continuación se procedió de acuerdo al protocolo de homogenización y reacción anterior.

La figura 4.5 muestra la media y error estándar de 4 repeticiones independientes de este experimento, que revela un aumento de aproximadamente un 60 % de la actividad basal de PKA inducido por la inyección de forskolina. El efecto consistente con una activación mediada por AMPc solo muestra efecto sobre la actividad basal sin efecto sobre la actividad total de PKA.

Estos resultados revelan la posibilidad de detectar variaciones transitorias de la actividad de PKA por estimulación *in vivo*, al menos por intervención farmacológica.



**FIGURA 4.5: Activación endógena y actividad total de PKA** en ganglios supracelulares de *Chasmagnathus* 10 min después de una inyección *in vivo* de solución salina o forskolina 10 μM. La actividad de PKA fue medida en condición basal, total e inhibida con PKI. La actividad remanente en presencia del inhibidor fue restada de la actividad basal y total. Media y error estándar de 4 experimentos independientes

#### 4.4 Discusión

En este capítulo se han determinado las condiciones para cuantificar la actividad PKA proveniente de *Chasmagnathus*, y siguiendo ese propósito se han comprobado en cangrejo, las principales características diagnósticas que demuestran el grado de conservación de esta enzima también en decápodos, como ser la especificidad por substratos, activadores e inhibidores específicos.

Se ha comprobado que existe en cangrejo una distribución diferencial de la enzima en distintas estructuras del sistema nervioso. Fueron determinados algunos de los posibles agentes endógenos o neurotransmisores que modulan la

actividad de PKA en sistema nervioso de cangrejo, tales como Octopamina y Dopamina.

#### **4.4.1 Actividad basal y total de PKA**

Existen distintos parámetros que permiten caracterizar la actividad de PKA en un tejido. La actividad total de PKA refleja la cantidad total de enzima y resulta mejor indicador de la actividad potencial de PKA en un tejido que de la actividad real en el, y la actividad basal de PKA que se refiere a la verdadera cantidad de PKA activa en el tejido en el momento de la medición. Mientras la actividad total solo puede modificarse por síntesis o degradación de la enzima, la actividad basal depende directamente del estado asociado-disociado de las subunidades regulatorias y catalíticas, lo cual es regulado endógenamente por el nivel de AMPc en las células y por la relación estequiométrica entre subunidades. Considerando la dificultad de preservar durante la condición *in vitro* el estado de activación endógeno, fueron ensayados en este capítulo varios métodos y ajustadas las condiciones que permiten medir actividad basal, total y cambios de la actividad basal producto de la estimulación.

#### **4.4.2 Distribución diferencial de PKA**

La función primaria de los neuropilos que conforman el sistema nervioso de crustáceos puede ser deducida en base a las aferencias provenientes de los órganos sensoriales. La estructura básica del sistema nervioso se encuentra muy conservada entre especies de crustáceos, y las diferencias halladas como ser el desarrollo diferencial en tamaño y arquitectura de distintos neuropilos muestran variaciones entre especies que se encuentran claramente vinculada con los hábitos comportamentales de cada especie. En otras palabras, la importancia que en una especie posee una dada capacidad sensorial y los comportamiento asociados puede ser reconocida por su representación neural (Sandeman et al., 1993). La serie de experimentos dirigidos a evaluar la distribución de la actividad

de PKA en sistema nervioso, también debe ser considerada teniendo en cuenta los hábitos y comportamientos de este cangrejo. *Chasmagnathus* es un animal altamente visual que habita zonas con una gran densidad de plantas que son movidas continuamente por el viento, y en ese contexto visualmente enriquecido los animales pueden diferenciar estímulos inocuos y peligrosos (Tomsic et al., 1993). La habilidad de *Chasmagnathus* de reconocer contextos, estímulos y de aprender y memorizar tareas de naturaleza visual, como ha sido largamente probado en el laboratorio (Maldonado et al., 1997; Tomsic et al., 1999), provee evidencias de la existencia un alto grado de procesamiento de la información visual. Los resultados de este capítulo revelan una distribución diferencial de la actividad de PKA en neuropilos y ganglios nerviosos. Mientras el lóbulo olfatorio, muestra el nivel mas elevado de actividad basal de PKA, los neuropilos ópticos y el protocerebro lateral, muestran los niveles mas altos de actividad total de PKA, con un 60-70% mas de actividad que neuropilos no ópticos. Estos resultados sugieren un papel importante de esta vía de transducción en los neuropilos involucrados en el procesamiento e integración de la información visual.

El cuerpo hemielipsoideo de cerebro de cangrejos constituye parte del protocerebro lateral y ha sido descrito como la estructura evolutivamente relacionada con los cuerpos pedunculados del cerebro de insectos (Hanström, 1947). En esta tesis se ha determinado que el protocerebro lateral es una de las estructuras del sistema nervioso de *Chasmagnathus* con mayor actividad de PKA, lo que también coincide con lo observado para los cuerpos pedunculados en cerebro de insectos (Müller, 1997). Los cuerpos pedunculados constituyen un área altamente integradora y con función probada en aprendizaje y formación de memorias asociativas (Menzel et al., 1994) Esta serie de coincidencias, sumadas a las conexiones directas con los neuropilos accesorios y lóbulos olfatorios (Baustein et al., 1988), sugieren que el protocerebro lateral es un lugar de integración sensorial y probablemente involucrado en aprendizaje asociativo.

#### 4.4.3 Moduladores endógenos de la actividad de PKA

El papel central de PKA en la formación de memoria de largo término en cangrejo ha sido demostrado en el capítulo anterior de esta tesis y por Romano y col.(1996 a y b). Existen también antecedentes en el mismo modelo que han comprobado la participación de neurotransmisores y receptores específicos, entre ellos ACh vía receptores de tipo muscarínicos (Berón de Astrada & Maldonado, 1999), Glutamato vía receptores de tipo NMDA (Troncoso & Maldonado, 2002), Angiotensina II y Angiotensina IV (Delorenzi & Maldonado, 1999). A pesar de haber abarcado a nivel sistémico e intracelular el estudio del proceso de formación de memoria, aún no se ha podido hallar el vínculo entre ambos niveles. En otras palabra, no se sabe aún en este modelo cual es el neurotransmisor o combinación de ellos que induce la activación de PKA para la formación de memoria.

En otros modelos se ha comprobado la participación de diversas aminas biogénicas como los neurotransmisores directamente responsables de la activación de PKA propia de los procesos de formación de memoria. En la abeja *Apis mellifera* y en *Drosophila* se ha determinado que el neurotransmisor octopamina media la vía del estímulo incondicionado durante el aprendizaje de una tarea asociativa olfatoria (Hammer & Menzel, 1995a, 1995b; Uzzan & Dudai, 1982) y que octopamina directamente induce una aumento en la actividad PKA (Müller, 1997). En el modelo de *Aplysia* se ha determinado también el papel de la amina serotonina en la mediación del estímulo incondicionado y la activación de la adenilato ciclasa en la terminal presináptica de la neurona sensorial (Glanzman et al., 1989; Müller & Carew, 1998). En mamíferos se ha determinado que la activación de PKA, fundamental para la formación de la potenciación de largo término en hipocampo así como para algunas formas de memoria, es en parte debido a la acción de receptores de dopamina D1 y D5 (Huang & Kandel, 1995).

En este capítulo se ha determinado que las aminas biogénicas, Octopamina y Dopamina, modulan la actividad de PKA en tejido nervioso de *Chasmagnathus*. Estos resultados y los antecedentes en otros modelos sugieren un papel de las aminas en la activación de PKA en sistema nervioso de *Chasmagnathus*. Sin

embargo, no se puede determinar mediante estos experimentos si el efecto observado de estimulación de PKA es directo o indirecto, ya que podría también ser reflejo de un aumento en la actividad neural general e inespecífica del tejido y por otro lado aún queda por demostrar el papel de estos neurotransmisores en la formación de memoria en *Chasmagnathus*.



## **Capítulo V**

**El entrenamiento y la exposición al  
contexto inducen la activación de  
PKA en ganglio supraesofágico**



## 5.1 Introducción

En el capítulo III de esta tesis se ha demostrado claramente el efecto disruptor que la inhibición de PKA posee sobre el proceso de consolidación de la memoria de largo término en el cangrejo *Chasmagnathus*. La administración de un análogo de AMPc que inhibe PKA durante el entrenamiento o en una ventana entre 4 y 8 horas después del entrenamiento resulta amnésica cuando la retención es evaluada 24 horas después.

Si bien de estos resultados se desprende claramente la conclusión de que la vía de transducción de AMPc-PKA debe estar intacta para el proceso de formación de memoria, no podría concluirse inequívocamente que esta vía este involucrada de forma activa y específica entre los mecanismos que subyacen la formación de la memoria. Por ejemplo, los resultados de intervención farmacológica podrían interpretarse de la siguiente manera: La reducción de los valores normales de actividad de PKA en las neuronas participantes en este aprendizaje altera el metabolismo y estado normal de esas células, bloqueando o deteriorando sus capacidades plásticas. Esta explicación descarta que PKA participe activamente en el proceso de consolidación y en cambio sugiere que la inhibición de PKA provoca un deterioro o alteración inespecífica del sistema que impide la formación de la memoria.

Sin embargo, como ya se ha hecho referencia previamente, la administración de un análogo de AMPc activador de PKA resulta facilitadora de la memoria (Romano et al, 1996a). Considerando conjuntamente los resultados del inhibidor y activador de PKA, resulta difícil interpretar ambos efectos como inespecíficos. Si la perturbación de la vía de transducción de AMPc-PKA afecta el metabolismo celular o la excitabilidad de las neuronas alterando de manera inespecífica sus capacidades plásticas, entonces en ambos casos esperaríamos ver un deterioro del proceso de consolidación y no una mejora como es en el caso del activador.

La activación o inhibición de PKA convierten a un entrenamiento en más fuerte o más débil respectivamente, hecho similar al que ocurre manipulando la

cantidad de ensayos (Romano et al., 1996 a,b y Capítulo III). Estos resultados farmacológicos sugieren entonces una vinculación entre el número de ensayos, la actividad de PKA y la formación de la memoria de largo término.

Para determinar de manera concluyente la existencia de una participación activa y específica de PKA entre los mecanismos responsables de la consolidación, además de las evidencias farmacológicas, esta vía debería activarse como consecuencia de la experiencia que induce la consolidación de la memoria de largo término.

**El objetivo de este capítulo fue investigar en *Chasmagnathus*, si la experiencia que lleva a la formación de la memoria contexto-señal induce la activación de la vía de transducción de AMPc-PKA.**

Con este objetivo se estudió la actividad de PKA en ganglio supraesofágico de animales entrenados. Se midieron los niveles de activación endógena y valores de actividad total de PKA durante los períodos críticos determinados en el capítulo III. Con el fin de comparar y establecer variaciones específicas inducidas por la experiencia se midió también la actividad de PKA en animales que solo estuvieron en el contexto de entrenamiento pero sin ser entrenados y en animales que no fueron ni estimulados ni cambiados de contexto.

Como ya se ha explicado en la introducción de esta tesis, el sistema nervioso de *Chasmagnathus* y decápodos en general, se encuentra dividido básicamente en tres estructuras llamadas ganglios. Uno de ellos es el ganglio supraesofágico, también denominado cerebro central. La elección del ganglio supraesofágico para medir posibles cambios en la actividad de PKA inducidos por el entrenamiento responde a diversos motivos: **a)** estudios neuroanatómicos y evolutivos que otorgan a los neuropilos del ganglio supraesofágico un papel central en el procesamiento de la información sensorial como así también funciones asociativas (Sandeman et al, 1993) (este aspecto ya ha sido más ampliado en el capítulo I); **b)** trabajos previos que revelaron en *Chasmagnathus* la activación de factores de transcripción luego del entrenamiento sugieren también un papel importante de este ganglio (Freudenthal et al, 1998), **c)** motivos prácticos: el ganglio supraesofágico

ofrece la ventaja de tener un acceso fácil para una rápida disección y tener masa suficiente para trabajar con muestras provenientes de animales únicos. Resultaría también de interés considerar para el análisis de actividad de PKA a los neuropilos ópticos y el protocerebro lateral, sin embargo el acceso difícil y la escasa masa de estos neuropilos no lo permitieron.

## 5.2 Materiales y Métodos

### 5.2.1 Tratamientos

Se trabajó con animales bajo tres tratamientos:

**Animales Naive (NV)**: provenientes directamente de la sala de mantenimiento y con un nivel de manipulación semejante a los demás animales sí tratados. La actividad de PKA medida en los animales NV fue considerada como el nivel normal o línea de base sobre la cual fueron analizados los posibles cambios producto de los tratamientos.

**Animales Entrenados (ENT)**: retirados de la sala de mantenimiento, colocados en el actómetro, sometidos a 5 min de adaptación y luego a un entrenamiento de 45 minutos conformado por 15 ensayos con un intervalo de 3 minutos entre ensayos (potocolo de entrenamiento fuerte, que induce la formación de la memoria contexto señal). Tiempo total de la experiencia: 50 minutos

**Animales Contexto (CTX)**: retirados de la sala de mantenimiento y alojados durante 50 minutos en los actómetros sin recibir estimulación.

En adelante se denominará tanto al entrenamiento como a la sola exposición al contexto como experiencia en forma genérica.

En todos los experimentos realizados los animales no habían sufrido manipulación alguna en los dos días previos al experimento y se tomó la

precaución de que los animales designados para cada una de las tres condiciones provenían del mismo lote.

Además de los tres tratamientos se trabajó a tres tiempos: 0, 6 y 24 horas después de la experiencia. Los animales sacrificados a tiempo 0 eran retirados directamente del actómetro después del último ensayo del entrenamiento, o bien después de cumplidos los 50 min de exposición al contexto. Los animales de 6 y 24 horas eran retirados del actómetro en el mismo momento que los animales de 0 horas y alojados individualmente y de manera aislada durante el período de espera. Los animales naive eran dejados en los recipientes originales en la sala de mantenimiento y eran sacrificados simultáneamente con los animales sometidos a experiencias a 0, 6 y 24 horas. (ver esquema del protocolo: Figura 5.1)

### **5.2.2 Extractos**

Al tiempo indicado, cada animal era rápidamente retirado del lugar donde estuviese alojado, enfriado durante 2 minutos en agua salobre a 0°C para anestesiarlo y luego rápidamente se practicaba la disección del ganglio supraesofágico.

Las condiciones de homogenización y reacción utilizadas, fueron las que se determinaron en el capítulo III de esta tesis y como ya se ha demostrado permiten revelar estados transitorios de activación de PKA. Brevemente, un único ganglio era homogenizado en 150 µl de buffer de homogenización (50mM TRIS pH7.5, 5mM EDTA, 2mM EGTA, 100mM NaCl, 100µM IBMX, 2mM β-mercaptoetanol, 0.01% Triton, 2mM Pirofosfato tetrasódico e inhibidores de proteasas: 1ugr/ml Pepstatin A, 10ugr/ml Leupeptin, 0.25mM PMSF, 10ugr/ml Aprotinin) a 0°C con un homogenizador de tipo vidrio-vidrio y el homogenato rápidamente utilizado para el ensayo de medición de actividad de PKA. Una alícuota de los extractos se guardaba para determinar concentración de proteínas en cada extracto por el método de Bradford.

El tiempo requerido desde que se retiraba al animal de donde estuviese alojado hasta el comienzo de la reacción de fosforilación era de

aproximadamente 3 ½ minutos. Centrifugación u otros pasos adicionales en la preparación de los extractos fueron evitados con el fin de reducir al máximo los tiempos entre la finalización de la experiencia y el comienzo de la reacción. La reducción al mínimo posible de estos tiempos resulta fundamental para mantener los estados de activación de PKA inducidos in vivo y evitar artefactos tales como la reasociación de la holoenzima de PKA durante la extracción (Roberson & Sweatt, 1996; Hildebrandt & Müller, 1995 a,b).

### 5.2.3 Ensayo de Fosforilación

La medición de actividad de PKA fue realizada por incorporación de  $^{32}\text{P}$  al sustrato específico de PKA, Kemptide, y separación del producto y el  $^{32}\text{P}$  no incorporado por el método del papel de fosfocelulosa (Roskoski, 1983). La reacción de fosforilación comenzaba con el agregado de 10  $\mu\text{l}$  de homogenato a 20  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción de modo tal que el volumen final de 30  $\mu\text{l}$  contenía: 50mM TRIS pH7.5, 5mM EDTA, 2mM EGTA, 100 $\mu\text{M}$  ATP, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP ( $2 \times 10^6$  CPM) y 100 $\mu\text{M}$  del sustrato específico de PKA, Kemptide)

Para cada extracto se midió la actividad de PKA en tres condiciones:

Actividad basal: determinación de la actividad endógena del tejido.

Actividad total: determinación de la actividad total de PKA en el tejido con agregado de 10  $\mu\text{M}$  de AMPc en la reacción.

Actividad inespecífica: determinación de la actividad dependiente de otras quinasas o pegado inespecífico de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP durante la determinación de actividad. Para esto se utilizó el inhibidor específico de PKA, 10  $\mu\text{M}$  PKI, en la reacción.

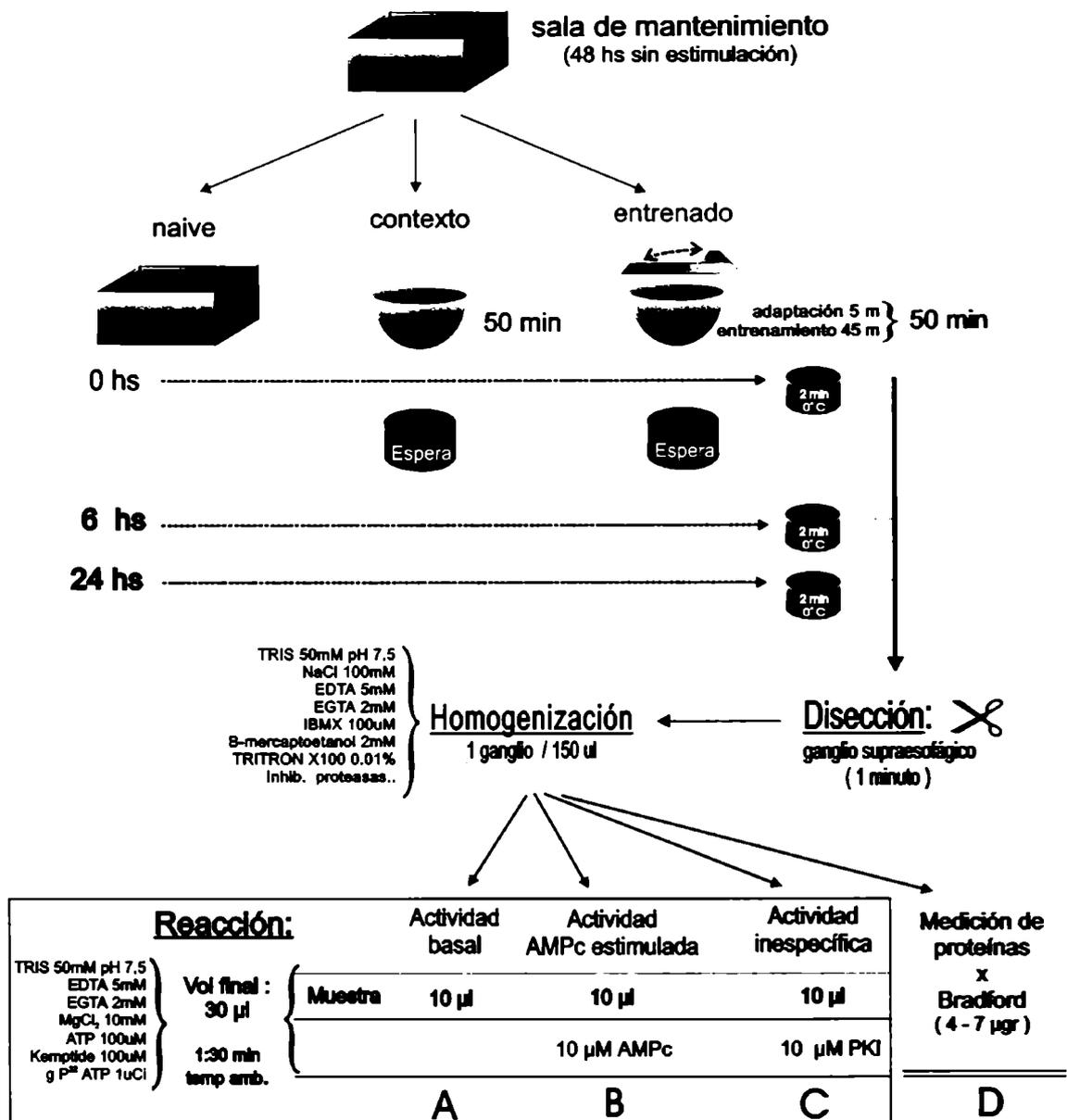
Todas las reacciones eran hechas por duplicado y fue considerado el promedio. La reacción duraba 1.5 minutos a temperatura ambiente y cumplido el tiempo 20  $\mu\text{l}$  de la misma eran sembrados sobre filtros de fosfocelulosa (Whatman P81). Los filtros eran lavados con agitación suave en 1% ácido

fosfórico (10 ml / filtro) luego secados y medidos con solución centelladora (Tolueno, POP, POPOP) en un contador de centelleo.

La breve duración de la reacción se ajustó de forma de reducir la posibilidad de que fenómenos de reasociación o disociación de la holoenzima *in vitro* enmascararan las diferencias de actividad endógena producto de los tratamientos. Se comprobó la linealidad de la reacción en el rango de tiempo de reacción (1.5 min) y para el rango de proteínas usado ( 4 - 7 µgr / reacción). Se verificó que en el tiempo y condiciones de reacción utilizadas, menos del 1 % del sustrato era convertido en producto.

La actividad específica basal y total de PKA de cada extracto se calculó restando el fosfato incorporado con el agregado de PKI y se relativizó al tiempo de reacción y la cantidad de proteínas. Los resultados fueron luego expresados en función de los niveles de actividad de PKA basal y total obtenidos para los animales naive. La actividad específica de PKA en los extractos de los animales naive fue de:  $0.464 \pm 0.022$  pmol/min/µgr de actividad basal y  $2.326 \pm 0.152$  pmol/min/µgr para actividad total

Figura 5.1  
 Protocolo para determinación de actividad de PKA  
 inducida por la experiencia



Actividad basal de PKA = (A - C) / D

Actividad total de PKA = (B - C) / D

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 El entrenamiento y la exposición a un contexto nuevo inducen aumento de la actividad basal de PKA

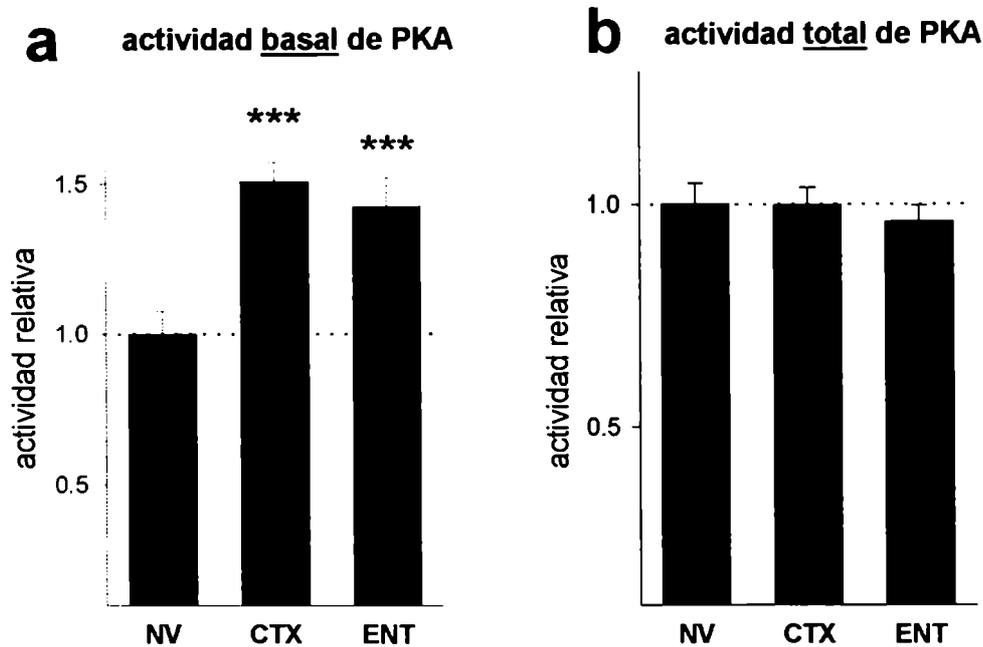
En la determinación de la ventana temporal de acción amnésica del inhibidor de PKA, se ha establecido la existencia de un primer período crítico de dependencia de PKA durante el entrenamiento, para la formación de la memoria de largo término (Capítulo III). Planteado el interrogante acerca de si el efecto farmacológico es producto de una acción indirecta o de la interferencia de los mismos mecanismos directamente inducidos por la experiencia, **el objetivo de los experimentos en esta sección fue explorar si existe aumento de la actividad de PKA inducido por el entrenamiento.**

Para tal objetivo y con el propósito de disecar el efecto de los estímulos que conforman el entrenamiento, se sometieron animales a tres tratamientos distintos: animales naive (NV), animales solo colocados en el contexto de entrenamiento, el cual constituye un contexto nuevo (CTX) y animales entrenados en dicho contexto (ENT), e inmediatamente después se midió la actividad de PKA en ganglio supraesofágico.

La actividad de PKA se midió en condición basal, lo que permite estimar el grado de activación endógeno producto de los distintos tratamientos, y con agregado de 10  $\mu\text{M}$  de AMPc en la reacción, lo que estimula el 100% de PKA en el extracto e indica la cantidad total de enzima independiente del grado de activación endógena.

La actividad basal de PKA en ganglio supraesofágico (Fig 6.2a) mostró diferencias significativas entre tratamientos, ANOVA  $F_{2,57} = 8.866$  ;  $p < 0.001$ . Los animales contexto mostraron un aumento significativo de un 50% respecto de los animales naive (contrastes Duncan,  $p < 0.001$ ) y los animales entrenados un 42% de aumento ( $p < 0.001$ ). No hubo diferencias significativas entre los grupos contexto y entrenado.

Inmediatamente después del tratamiento no se han encontrado diferencias en la actividad total de PKA, ANOVA  $F_{2,57} = 0.319$ . (figura 6.2.b).

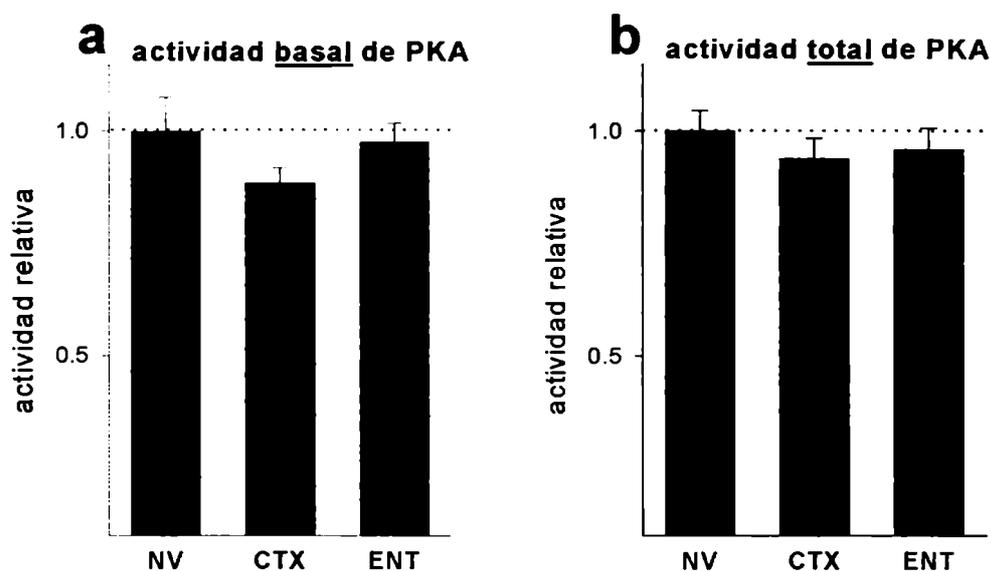


**FIGURA 5.2:** actividad basal y total de PKA en ganglio supraesofágico inmediatamente después de la exposición al contexto (CTX) o del entrenamiento (ENT). Los gráficos representan media  $\pm$  ES de la actividad PKA basal (a) y total (b) normalizada a la actividad promedio obtenida en los animales naive (NV) o. ( $n_{NV} = 14$ ;  $n_{CTX} = 23$ ;  $n_{ENT} = 23$ ). Contrastes Duncan post-ANOVA: \*\*\* para  $p < 0.001$  en comparaciones vs. naive.

Estos resultados indican que inmediatamente luego de la experiencia de 50 minutos, tanto la exposición al contexto nuevo como el entrenamiento que induce la formación de la MCS, existe una activación de PKA sin cambios en los niveles totales de enzima, lo que resulta consistente con un aumento de la actividad mediado por AMPc.

A pesar de esta conclusión, evaluamos si el aumento de la actividad de PKA hallado 6 horas después del entrenamiento era sostenido como un cambio a largo término. El argumento para evaluar esto fue que la actividad de PKA, aunque no responsable de la evocación, participara en el mantenimiento de la memoria de largo término y su bloqueo no se evidenciara inmediatamente, como ya fue demostrado en los experimentos anteriores para las activaciones de 0 y 6 horas que se evidencia recién 24 horas después. Aunque esta hipótesis no fue evaluada de manera farmacológica, en el siguiente experimento se evaluó si existía un aumento de la actividad de PKA 24 horas después del entrenamiento.

Se establecieron los mismos grupos y tratamientos que en las secciones anteriores y luego de las experiencias se los alojó individualmente. 24 horas después se los sacrificó junto con animales naive del mismo lote. Los resultados que se muestran en la figura 5.4 no revelan diferencias significativas para ningún tratamiento, tanto en actividad basal (ANOVA  $F_{2,49} = 0.04$ ), como en actividad total de PKA (ANOVA  $F_{2,49} = 0.038$ ), comprobándose que los valores de actividad de PKA se reestablecen 24 horas después del tratamiento.



**FIGURA 5.4:** actividad basal y total de PKA en ganglio supraesofágico 24hs después de la exposición al contexto (CTX) o del entrenamiento (ENT). Los gráficos representan media  $\pm$  ES de la actividad PKA basal (a) y total (b) normalizada al promedio de la actividad obtenida en los animales naive (NV). ( $n_{NV} = 14$ ;  $n_{CTX} = 18$ ;  $n_{ENT} = 20$ ).

## 5.4 Discusión

Diferentes estrategias experimentales han sido empleadas en paradigmas de aprendizaje y plasticidad sináptica para probar el papel de la vía de transducción de AMPc-PKA en la formación de la memoria. Posiblemente una de las más utilizadas haya sido justamente la manipulación farmacológica de la actividad de PKA: en los modelos de plasticidad sináptica en *Aplysia* (Brunelli et al., 1976; Kandel and Schwartz, 1982, Chain et al., 1999), y de plasticidad sináptica en hipocampo de roedores (Hopkins & Johnston, 1988; Slack & Pocket, 1991; Frey et al., 1993; Weisskopf et al., 1994; Huang & Kandel, 1994; Brandon et al., 1995; Nguyen & Kandel, 1996; Woo et al., 2000), en memoria de largo término en *Apis mellifera* (Fiala et al., 1999; Müller, 2000); en *Chasmagnathus* (Romano et al., 1996 a y b) y en roedores (Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Szapiro et al., 2000; Vazquez et al., 2000). En resumen, todos estos trabajos encuentran a través de la activación o inhibición farmacológica de PKA, una relación causal sólida entre el estado de actividad de PKA y la ocurrencia del fenómeno de plasticidad sináptica o la formación de la memoria. Sin embargo, no permiten establecer si la acción de esta vía de transducción es intrínseca de los mecanismos endógenos y fisiológicos que participan en la consolidación de la memoria.

A pesar de que todos estos trabajos llevan a interpretar que la activación de PKA sería entonces un elemento central en diferentes etapas del fenómeno de plasticidad, muy pocos trabajos incluyendo algunos de los ya mencionados han demostrado fehacientemente que exista un aumento en la actividad de PKA como consecuencia de la experiencia o de la estimulación que induce el cambio: en la facilitación sináptica en *Aplysia* (Müller & Carew, 1998) en hipocampo de rata (Roberson & Sweatt, 1996); en aprendizaje en abeja (Müller, 2000) y en aprendizaje en ratas (Bernabeu et al., 1997; Vazquez et al., 2000).

Los resultados expuestos en este capítulo revelan aumento en los niveles de actividad basal y total de PKA en ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus* como consecuencia de someter a los animales a distintas experiencias. Estos

resultados constituyen correlaciones entre patrones de estimulación y cambios en actividad de PKA. Como correlaciones, poco pueden aclarar acerca de la relación causal entre su ocurrencia y la formación de memoria de largo término. Sin embargo, en conjunto con los resultados del capítulo III, constituyen una fuerte y esclarecedora evidencia sobre el papel de la vía de transducción de AMPc-PKA en la formación de la memoria de largo término de cangrejo *Chasmagnathus*. En otros términos, el entrenamiento que induce la formación de la memoria contexto-señal, induce también un aumento en la actividad de PKA en ganglio supraesofágico. El bloqueo farmacológico de esta activación resulta disruptor del proceso de consolidación. Estas evidencias apoyan la hipótesis de que la activación de la vía AMPc-PKA es parte fundamental de sistema intrínseco de formación de la memoria en *Chasmagnathus* y que el efecto de los activadores e inhibidores de PKA sobre la consolidación es el resultado de la intervención directa de los procesos iniciados por la experiencia.

De acuerdo con las mediciones de actividad de PKA a distintos tiempos después del entrenamiento y de la sola exposición a un contexto nuevo, hemos encontrado que experiencias distintas inducen activaciones de PKA con cursos temporales propios. El entrenamiento que induce la formación de la MCS provoca una activación de PKA que fue medida inmediatamente después del entrenamiento y 6 horas después del mismo. En cambio, la activación de PKA después de la sola exposición al contexto fue medida solo inmediatamente después de la experiencia.

A continuación se analizarán en detalle los aspectos diferenciales de la activación de PKA, con relación a las dos experiencias evaluadas, entrenamiento y exposición al contexto, y en relación a los dos periodos críticos de dependencia de PKA para la formación de la memoria contexto señal.

### 5.4.1 Animales Entrenados

Los resultados obtenidos en base a intervención farmacológica del capítulo III y los de correlación bioquímica de este capítulo indican que existe una activación temprana de PKA inducida durante el entrenamiento, que es fundamental para la instalación de la memoria.

Sin embargo, los resultados farmacológicos del capítulo III indican que la primera fase de dependencia de PKA se reduce al tiempo del entrenamiento, mientras los resultados de correlación bioquímica en este capítulo muestran que la activación persiste aún después del mismo. Esto puede ser interpretado tomando en cuenta los resultados obtenidos con una condición intermedia de entrenamiento y el efecto sobre la memoria del activador de PKA. El entrenamiento de 12 ensayos, muestra ser suficiente para inducir la consolidación, pero en dicho caso la inhibición de PKA post-entrenamiento sí es amnésica. La acción facilitadora del activador de PKA se cumple administrado pre y post-entrenamiento (Romano et al., 1996 b). Estas evidencias en conjunto sugieren que la activación de PKA necesaria en la primer fase de la consolidación comienza durante el entrenamiento como consecuencia de los ensayos y persiste después del mismo. La activación inducida de PKA, persistente después del entrenamiento, resulta necesaria para la consolidación en entrenamientos mas cortos, pero no así en la condición del entrenamiento fuerte de 15 ensayos, como lo demuestra la administración sin efecto del inhibidor de PKA inmediatamente después del mismo.

Aún desconocemos en *Chasmagnathus* cuales son las vías neuroquímicas y receptores directamente involucrados en la activación de PKA durante el entrenamiento. Sin embargo, en base a los resultados de este capítulo podemos extraer algunas conclusiones acerca de los mecanismos de la activación de PKA producto del entrenamiento. La actividad total de PKA no aumenta inmediatamente después del entrenamiento como sí lo hace la actividad basal. Por otro lado, el inhibidor de PKA que muestra efecto amnésico es un análogo competidor del AMPc. Estos resultados en conjunto

indican que la activación temprana de PKA producto del entrenamiento es mediada por un aumento de AMPc, como se ha observado en las fases tempranas de la facilitación sináptica en *Aplysia* (Kandel & Schwartz; 1982), en la potenciación de largo término en la región CA1 de hipocampo (Roberson & Sweatt, 1996) y en la formación de memoria de largo término en *Apis mellifera* (Müller, 2000).

Se ha determinado que un mecanismo distinto e independiente de AMPc es responsable de la activación de PKA observada en hipocampo durante las fases tempranas de la consolidación en ratas. En dos paradigmas de aprendizajes en los que esta involucrado el hipocampo se ha encontrado inmediatamente después del entrenamiento, un aumento en la actividad total de PKA (Vazquez et al., 2000) y se ha probado el papel crítico de una activación de PKA independiente de AMPc (Bernabeu et al., 1997). Estos hallazgos no resultan congruentes con el mecanismo de activación de PKA comprobado durante la formación de la potenciación de largo término en hipocampo (Roberson & Sweatt, 1996) a pesar de la posible vinculación entre ambos fenómenos. Sin embargo, dicha discrepancia puede provenir del hecho de que en el paradigma de aprendizaje de rata no se han medido los niveles basales de actividad de PKA sino la actividad total de la misma, lo que no resulta una reflejo fiel de la actividad endógena.

En *Chasmagnathus*, al igual que en mamíferos (Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladaze et al., 1998) se ha encontrado un segundo período de aumento de la actividad de PKA durante la consolidación. En este segundo período, centrado en las 6 horas después del entrenamiento para *Chasmagnathus*, se ha encontrado aumentada la actividad basal y total de PKA en ganglio supraesofágico. Por otro lado, la inhibición de PKA en un período entre 4 y 8 horas después del entrenamiento posee efecto amnésico. Por lo tanto concluimos que la actividad elevada de PKA a las 6 horas, igual que la determinada inmediatamente después del entrenamiento, es parte de los procesos inducidos por la propia experiencia y un mecanismo participante de la consolidación de la memoria de largo término.

La activación persistente de PKA horas después de una experiencia se ha reportado como mecanismo fundamental para el paso de la facilitación sináptica de corto a largo término en *Aplysia*. Se ha demostrado que el mecanismo responsable de esta persistencia de la actividad de PKA es la degradación de la subunidad reguladora y la consecuente desinhibición de las subunidades catalíticas (Chain et al., 1999). Si bien no se conocen en cangrejo los mecanismos responsables del aumento de la actividad de PKA 6 horas después del entrenamiento, se ha observado que el aumento en la actividad basal coincide con un aumento en la actividad total. No podemos descartar que durante este período exista también un nivel elevado de AMPc o una degradación de las subunidades regulatorias, responsable del aumento en la actividad basal, sin embargo el aumento de la actividad total de PKA producto de un aumento neto en la cantidad de enzima puede por sí solo ser responsable del aumento en la actividad basal.

En el modelo de facilitación sináptica en *Aplysia*, se ha demostrado que 24 horas después de la inducción, la actividad basal de PKA permanece elevada (Müller and Carew, 1998). A pesar del mantenimiento de la actividad elevada por un tiempo tan prolongado se ha demostrado que la actividad no es necesaria para la expresión de la facilitación de largo término (Hegde et al., 1997). En el cangrejo *Chasmagnathus* el aumento en la actividad basal y total de PKA no persiste mientras dura la memoria, como se evidencia del reestablecimiento de los valores normales 24 hs después del entrenamiento. También se ha demostrado que la evocación o expresión de la memoria en cangrejo no resulta dependiente PKA.

#### **5.4.2 Animales expuestos al contexto**

En el modelo de *Chasmagnathus*, al igual que en otros modelos y paradigmas de aprendizaje utilizados para el estudio de los mecanismos bioquímicos implicados en memoria, se diseñan experimentos para idealmente diferenciar los correlatos bioquímicos que son producto del procesamiento de la estimulación, de los correlatos específicamente involucrados en el aprendizaje y la formación de memoria. Con este objetivo y en un intento por acercarse a la

situación en la cual el animal recibe la estimulación pero no aprende ni memoriza, resulta una estrategia común presentar al animal los estímulos de forma no pareada o en forma única. Luego se evalúa la respuesta aprendida y aquellos animales que no han recibido la presentación pareada de los estímulos responden como animales naive, y por lo tanto se considera a los correlatos bioquímicos observados en dichas situaciones como propios de la estimulación y no del aprendizaje. Sin embargo, considerar a estos últimos como animales que no han aprendido, consiste un error cuando se quiere evaluar aspectos bioquímicos involucrados en la formación de memoria, ya que estos animales sí han aprendido, aunque no lo que el experimentador está evaluando.

En el paradigma de memoria contexto-señal del cangrejo, el cual muestra características de una memoria asociativa (Maldonado et al., 1997), la respuesta aprendida es la disminución de la respuesta de escape, que es específica del estímulo y del contexto. Esto no deja dudas acerca de que el contexto de entrenamiento posee claves y componentes que resultan salientes, aprendidas y luego reconocidas por el animal. En las experiencias farmacológicas se ha utilizado largamente como control a los animales expuestos al contexto, que reciben la misma manipulación y droga que los animales entrenados, pero sin el pasaje reiterado del estímulo de peligro. Es necesario considerar, que este contexto resulta un nuevo ambiente para los animales, tanto como lo es para los animales entrenados en él, y por lo tanto fenómenos de tipo asociativo entre componentes del contexto y aprendizajes no asociativos como la habituación a un contexto novedoso, deben ser considerados. Estos aprendizajes que no son los que están siendo evaluados por el experimentador traen aparejados mecanismos transduccionales propios de ese aprendizaje, similares o no a los observados en los animales entrenados al pasaje de la figura. En resumen, los animales expuestos al contexto deben ser evaluados como animales expuestos a otra experiencia, mas que como animales control que no aprenden.

Las mediciones de actividad de PKA en los animales que permanecieron en el contexto durante 50 minutos sin ser estimulados, muestran alto grado de

activación de PKA inmediatamente después de la experiencia, similar a la observada en los animales entrenados. En los animales entrenados se probó un papel fundamental de esta activación temprana para la consolidación, esto podría llevar a pensar en la existencia de un mecanismo común en la consolidación de una memoria de contexto y la memoria contexto-señal. Sin embargo se ha demostrado también que ambas experiencias inducen activaciones de PKA con cursos temporales distintos. A diferencia del entrenamiento, la exposición al contexto no indujo activación de PKA 6 horas después de la experiencia. Dado que los tiempos a los que se midió el aumento en la actividad de PKA fueron elegidos en base a los periodos críticos de dependencia de PKA determinados para los animales entrenados, sería necesario buscar también a otras horas para determinar si la exposición al contexto induce ventanas de activación de PKA distintas a las del entrenamiento, ya que posiblemente la consolidación de la memoria de contexto muestre periodos críticos distintos.

Un fenómeno similar se ha estudiado en mamíferos (Viana et al., 2000). Se ha observado en ratas que la habituación de la exploración de un contexto nuevo induce un aumento rápido y transitorio de la actividad de PKA en el hipocampo similar al observado en el caso de un aprendizaje asociativo. Sin embargo la inhibición de PKA no impide la retención de la memoria de contexto. Se ha demostrado en ese caso que la activación de PKA en esa circunstancia esta vinculada con el reconocimiento de una situación novedosa (Vianna et al., 2000). Al igual que lo observado en cangrejo, se ha demostrado en ratas que la habituación al contexto tampoco muestra una segunda ventana de activación de PKA como si lo muestra el aprendizaje de una evitación pasiva (Bernabeu et al., 1997).

Existen observaciones en *Chasmagnathus* que sugieren la existencia de una memoria del contexto en los cangrejos que permanecen durante una hora en el actometro (comunicación personal, Maldonado & Hermitte). Es necesario diseñar y llevar a cabo experiencias para evaluar si la activación de PKA observada luego de la exposición al contexto forma parte de un aprendizaje

relacionado con el contexto o si es un efecto producto de la estimulación o posiblemente ligado a la novedad.

## **Capítulo VI**

### **Identificación y caracterización de isoformas de PKA en sistema nervioso de *Chasmagnathus***



## 6.1 Introducción

La proteína quinasa dependiente de AMPc ha sido estudiada en numerosos modelos animales, y muchas de sus características estructurales y catalíticas se encuentran conservadas. Ahora que los mecanismos de activación de PKA son bien comprendidos, y que se ha encontrado una vasta cantidad de procesos celulares mediados por PKA, emergen preguntas que apuntan a revelar los mecanismos que determinan la especificidad de su acción. Al respecto resulta intrigante, como múltiples factores elevan los niveles de AMPc en la célula y sin embargo solo un limitado grupo de sustratos son fosforilados por PKA en respuesta a una hormona o neurotransmisor en particular (Skålhegg & Tasken, 2000). Esta especificidad resulta particularmente importante en el sistema nervioso por el hecho de que la misma vía de transducción puede controlar diversas respuestas fisiológicas y los cambios suelen ser dirigidos a sitios tan restringidos como una o pocas sinapsis.

La existencia de diferentes isoformas de PKA y sus comportamientos particulares, como ser, diferentes cinéticas y características de activación, expresión tejido-específica, distribución subcelular y posibilidad de interacción con otras moléculas como proteínas de anclaje, han sido consideradas como determinantes de la especificidad de acción.

Dos isoenzimas de PKA, denominadas de tipo I y II (PKA I y PKA II, respectivamente) fueron identificadas inicialmente en base a su perfil de elución de columnas de cromatografía de intercambio aniónico (Reimann et al., 1971; Corbin et al., 1975). Estas dos isoformas de PKA mostraron compartir la misma subunidad catalítica y diferenciarse en la subunidad regulatoria, denominadas subunidad regulatoria de tipo I y II (R I y R II). Las técnicas de biología molecular permitieron luego identificar con precisión en distintos modelos la existencia de dos genes de la subunidad R I, denominadas R I  $\alpha$  (Lee et al., 1983; Sandber et al., 1987) y R I  $\beta$  (Clegg et al., 1988; Solber et al., 1991) y dos genes para R II, R II  $\alpha$  (Scott et al., 1987; Øyen et al., 1989) y R II  $\beta$  (Jahnsen et al., 1986). También se han identificado tres genes para la subunidad catalítica, C $\alpha$ , C $\beta$  y C $\gamma$  (Uhler et al., 1986 a, b; Beebe et al., 1990).

Los resultados expresados en los capítulos anteriores, basados en la intervención farmacológica del proceso de consolidación y en las mediciones que muestran el aumento de la actividad de PKA inducida por un entrenamiento, revelan un papel fundamental de esta vía de transducción en el proceso de formación de la memoria.

Considerando la falta de información acerca de PKA en sistema nervioso de crustáceos y con el propósito de evaluar posteriormente la participación específica de isoformas de PKA en el proceso de formación de memoria, el objetivo del presente capítulo fue identificar y caracterizar isoformas de PKA en sistema nervioso de *Chasmagnathus*.

Con este objetivo, se identificaron inicialmente en base a separación en cromatografías de intercambio distintas fracciones de PKA provenientes de tejidos nerviosos y también no nervioso de *Chasmagnathus*. Luego estas fracciones fueron caracterizadas en base a su sensibilidad por diferentes nucleótidos cíclicos y capacidad de autofosforilación.

## **6.2 Materiales y métodos**

### **6.2.1 Preparación de extractos**

Animales naive eran enfriados en agua con hielo durante 2 minutos e inmediatamente se realizaba bajo lupa la disección de los tejidos, manteniendo al animal a 4 °C. Una vez disecado el tejido, este era inmediatamente congelado y conservado en tubos plásticos tipo "Eppendorf" en nitrógeno líquido. De este modo se obtuvieron 40 ganglios supraesofágicos (que contienen al protocerebro medial, deutocerebro y tritocerebro), 40 protocerebros lateral (medula terminal y cuerpo hemielipsoideo) y 5 branquias como muestra de un tejido no nervioso. Una vez obtenida la cantidad indicada los tejidos eran descongelados y homogenizados en 2 ml de (EDTA 5 mM, EGTA 2 mM, Pepstatin A1 µgr/ml, Leupeptin 10 µgr/ml, 0.25 mM PMSF, Aprotinin 10 µgr/ml in Tris 50 mM, pH 7,5) utilizando un homogenizador de tipo vidrio-vidrio. Las fracciones citosólica y particular fueron separadas por

ultracentrifugación (100.000 x g , 15 min), el precipitado resuspendido y re-homogenizado en el mismo volumen del sobrenadante. Ambas fracciones era luego nuevamente congeladas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

### 6.2.2 Cromatografía de intercambio aniónico

Las cromatografías de intercambio aniónico fueron realizadas en columnas de 0.5 ml de resina DE-52 preparadas dentro de jeringas plásticas de 1 ml. Todas las soluciones utilizadas para equilibrar, lavar y eluir las colmunas fueron preparadas con Tris 50 mM pH 7.5 y en el caso de la elución también con 15 % de glicerol y la concentración indicada de NaCl. El cargado, lavado y elución de las columnas fueron realizados mediante una bomba peristáltica a un flujo constante de 0.5 ml/minuto.

Los extractos fueron descongelados, el volumen de los mismos llevado a 10 ml y cargados en las columnas. Una vez cargada la muestra, las columnas eran lavadas con 5 ml y la elución de las mismas realizada con un gradiente de NaCl de 0 a 300 mM en saltos discretos de 12.5 mM por cada 1 ml. Las fracciones recolectadas de 1 ml, eran rápidamente subdivididas en alícuotas y congelada en nitrógeno líquido para luego ser utilizadas para distintos fines.

### 6.2.3 Ensayo de fosforilación *in vitro*

Se practicaron reacciones de fosforilación *in vitro* para revelar:

- a) el perfil de elución de actividad de PKA de las cromatografías de intercambio aniónico;
- b) la sensibilidad de distintas fracciones de PKA a distintos nucleótidos cíclicos.

En ambos casos el protocolo de la reacción de fosforilación fue similar excepto que en a) se utilizaró concentración fija y saturante de AMPc (10 $\mu$ M) y en b) se utilizaron diferentes nucleótidos cíclicos a concentración variable (indicado en cada caso).

El substrato específico de PKA "Kemptide" fue utilizado como aceptor exógeno de <sup>32</sup>P.

Diez  $\mu\text{l}$  de cada fracción eluida fueron preincubados 5 minutos a temperatura ambiente en un volumen de 30  $\mu\text{l}$  en presencia o ausencia de la concentración indicada del nucleótido cíclico y con o sin el inhibidor específico de PKA, PKI (2 $\mu\text{M}$ ). La reacción de fosforilación comenzó con el agregado de 10  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción para una concentración final en 40  $\mu\text{l}$  de: 50  $\mu\text{M}$  Kemptide, 100  $\mu\text{M}$  ATP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.25 mg/ml BSA, 50 mM Tris pH 7.5 y 1  $\mu\text{Ci}$  de ( $\gamma^{32}\text{P}$ )-ATP. Luego de 5 minutos de reacción a temperatura ambiente la reacción fue detenida sembrando 20  $\mu\text{l}$  de la reacción en papeles de fosfocelulosa de 2 x 2 cm. El ATP no incorporado al substrato fue removido del papel de fosfocelulosa mediante agitación suave de los papeles en 1% de ácido fosforico durante 2 horas. Los papeles fueron secados y colocados en viales con 2 ml de solución centelladora (Tolueno-POP-Popop) y medidos en un contador de centelleo Beckman.

La actividad de PKA en cada fracción fue estimada restando la actividad remanente en presencia del inhibidor específico de PKA, PKI 2  $\mu\text{M}$ , a la actividad obtenida con AMPc 10  $\mu\text{M}$  y expresada como unidades de actividad de PKA relativa al volumen de fracción medido.

Las constantes de activación ( $K_a$ ) para AMPc y otros nucleótidos cíclicos utilizados para cada isoforma de PKA, fue calculada por el ajuste de los datos de tres curvas de activación de experimentos independientes a una curva logística no lineal de 4 parámetros. La concentración de activador necesaria para obtener el 50% de la activación máxima fue calculada mediante la formula de la curva ajustada (programa: Sigma Plot 5.0)

#### **6.2.4 Ensayo de auto-fosforilación**

Las condiciones de la auto-fosforilación consistieron en 20  $\mu\text{l}$  de la fracción eluida y 10  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción para una concentración final en 30  $\mu\text{l}$  de: 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  ATP, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA y 15  $\mu\text{Ci}$  ( $\gamma^{32}\text{P}$ )-ATP en presencia o ausencia de 10  $\mu\text{M}$  AMPc o 2 $\mu\text{M}$  PKI. La reacción se hizo por 5 minutos a temperatura ambiente y se detuvo mediante el agregado de 10  $\mu\text{l}$  de buffer de siembra ( 5% dodecil sulfato de sodio (SDS), 5% 2-mercapto-etanol, 15 % glicerina, 0.5 M Tris, pH 6.8. 15  $\mu\text{l}$  de la reacción

fueron sujetos a una corrida electroforética en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). El gel fue secado y expuesto por 12 horas en una película KODAK AR-5 X-Omat.

### 6.2.5 Drogas

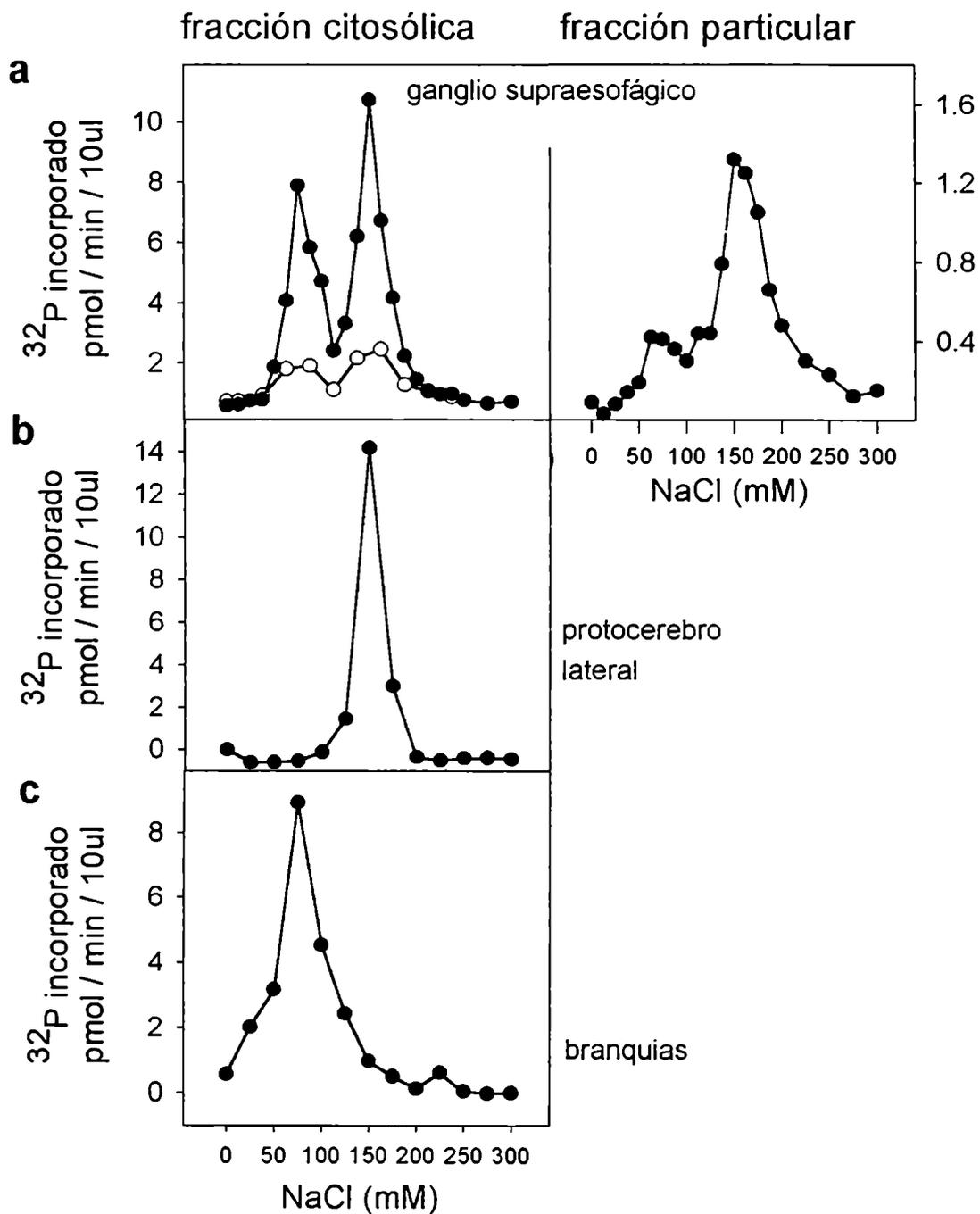
El AMP cíclico, GMP cíclico, el substrato específico de PKA "Kemptide" y el inhibidor específico de PKA, PKI (6-22) amida, fueron obtenidos de Sigma. Los análogos de AMPc: 5,6-dicloro-benzimidazol ribosido-3,5- monofosforitioato, Sp-isomer (Sp-5,6-DCI-cBIMPS) y N-mono-t butilcarbamoiladenosina Sp-3',5'-monofosfato (MBC-cAMP) fueron obtenidos de Biolog, Alemania.

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Isoformas de PKA en *Chasmagnathus*

Con el objetivo de estudiar la presencia de isoformas de PKA en tejido nervioso de *Chasmagnathus*, extractos de ganglio supraesofágico fueron separados en fracción citosólica y particular, y luego sujetos a separación en una cromatografía de intercambio aniónico.

Para revelar la presencia de PKA en las fracciones eluidas de la columna, se midió en cada una de ellas la actividad fosfotransferasa en presencia del substrato exógeno específico de PKA, Kemptide. El perfil de actividad PKA eluida de los extractos citosólicos mostró dos picos. Un perfil representativo de 10 repeticiones de este experimento se muestra en el panel de la izquierda de la figura 6.1.a. Este resultado es comparable al perfil de elución obtenido para las dos isoformas de PKA presentes en tejidos de mamíferos, PKA I eluye a concentraciones de NaCl menores a 100mM y PKA II eluye entre 150 y 200 mM NaCl (Beebe & Corbin, 1986). La actividad de PKA eluida en el segundo pico fue al menos un 25% mayor a la primera. Este resultado contrasta con la proporción de isoformas hallada en insectos, en los cuales la isoforma I de PKA no es detectable en tejido nervioso de animales adultos (Müller, 1997).



**Figura 6.1: Perfiles de elución de la actividad de PKA de cromatografías de intercambio aniónico.**

a) extractos citosólicos (derecha) y particulares (izquierda) de ganglio supraesofágico; b) de protocerebro lateral y c) branquias. La actividad fue medida en presencia de  $10\ \mu\text{M}$  (●) o en condición basal (○). En branquias y protocerebro lateral la actividad fue solo medida cada dos fracciones.

Una característica distintiva de PKA II, bien estudiada en mamíferos e insectos, es su capacidad de unirse a través de la subunidad regulatoria a proteínas de anclaje que la mantienen asociada a fracciones de membrana y microtúbulos (Schulman, 1995; Faux & Scott, 1996; Han et al., 1997). De acuerdo a lo esperado, el perfil de elución de la fracción particular muestra al menos 3 a 4 veces mas proporción de PKA II que PKA I (figura 6.1.a, panel de la derecha). El pequeño pico correspondiente a PKA I puede explicarse en términos de una contaminación con la fracción citosólica, o bien de la posibilidad de una fracción de PKA I asociada a proteínas de anclaje de tipo dual mucho menos frecuentes (Huang et al., 1997).

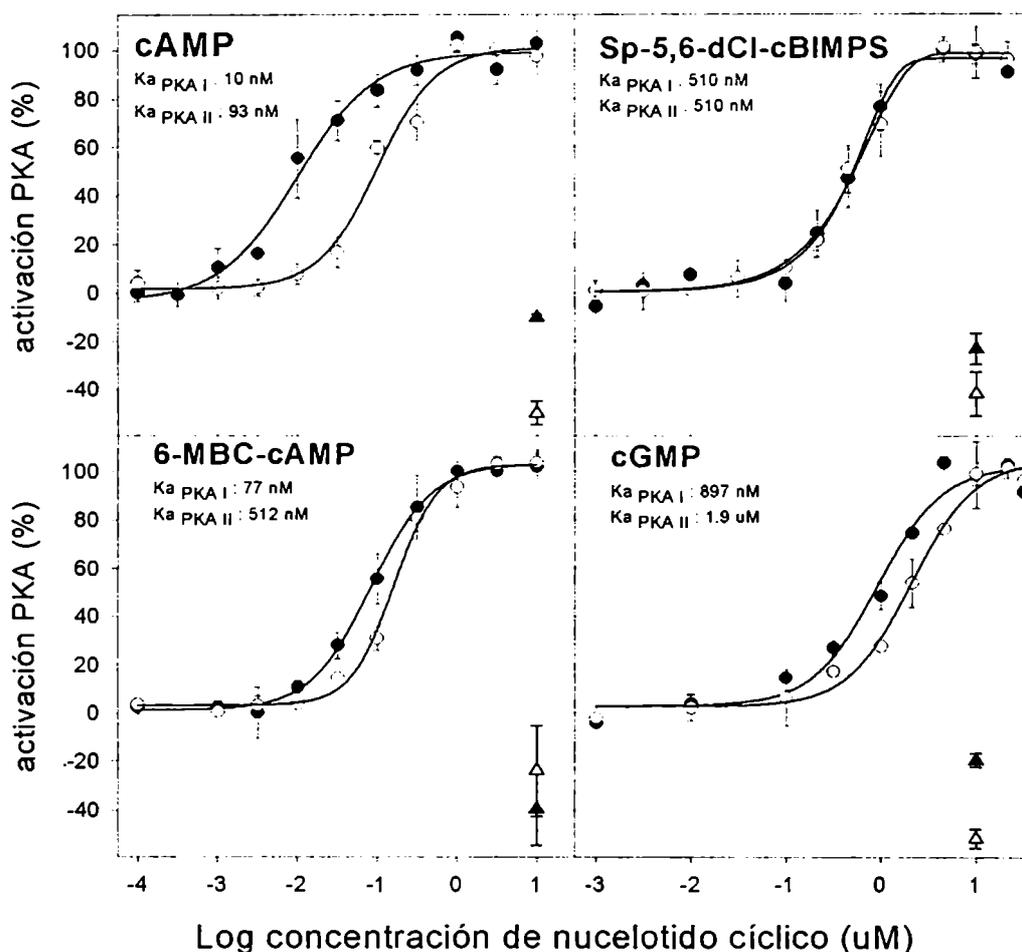
Considerando una posible expresión y distribución tejido específica de estas dos isoformas de PKA en cangrejo, se separaron por cromatografía extractos provenientes de otra estructura nerviosa, el protocerebro lateral, que contiene a la medula terminal y el cuerpo hemielipsoideo. La figura 6.1.b. muestra un perfil representativo de los resultados obtenidos para 5 repeticiones de este experimento, en la que se observa un perfil de actividad de PKA con un único pico de elución que coincide en salinidad al segundo pico obtenido para los extractos de ganglio supraesofágico, correspondiente a PKA II. En base a esta técnica no podemos ser concluyentes y dejar de considerar una muy baja proporción de PKA I, que en algunas de la repeticiones apareció con una ínfima proporción (resultados no mostrados).

Finalmente se evaluaron mediante el mismo método extractos provenientes de un tejido no nervioso. El perfil de actividad PKA eluido de una cromatografía de extractos citosólicos de branquia, mostró un único pico de actividad correspondiente a la fracción I. La figura 1.c muestra un perfil representativo de tres repeticiones independientes.

### **6.3.2 Sensibilidad de las isoformas de PKA a nucleótidos cíclicos**

Una vez identificada la presencia de distintas fracciones de PKA en tejido nervioso de *Chasmagnathus*, el siguiente objetivo fue caracterizar la activación de estas en base a su sensibilidad por distintos nucleótidos cíclicos. Con este

propósito se tomaron las fracciones centrales de cada pico de actividad PKA eluida de ganglio supraesofágico y se practicaron reacciones de fosforilación *in vitro* con cantidades crecientes nucleótidos cíclicos activadores. Para asegurar la medición de actividad fosfotransferasa específica de PKA y descartar la presencia de otra posibles quinasas que coeluyan con PKA, posiblemente activadas por nucleótidos cíclicos como por PKG, se utilizó el substrato específico, Kemptide, y se comprobó también la total inhibición de la actividad inducida por los activadores con el inhibidor específico, PKI.



**Figura 6.2 Activación de PKA con nucleótidos cíclicos.** Los gráficos muestran la activación de las dos fracciones de PKA eluidas de extractos de ganglio supraesofágico; fracción I (●), fracción II (○). La activación para concentraciones crecientes de los nucleótidos cíclicos esta expresada como porcentaje de la activación máxima con 10  $\mu$ M de AMPc y tomando como 0 de activación a la actividad basal.  $\blacktriangle$  y  $\triangle$ , muestran la inhibición con 2  $\mu$ M de PKI de la actividad máxima de cada fracción y cada nucleótido. Los datos representan media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes y la curva de activación calculada en base al ajuste logístico no lineal de 4 parámetros, en todos los casos  $P < 0.0001$ .  $K_a$ : concentración del nucleótido para 50% de activación.

Como se observa en la figura 6.2.a , la fracción I mostró aproximadamente 10 veces mas sensibilidad al AMPc que la fracción II. Las constantes de activación ( $K_a$ ) para AMPc resultaron 10 nM y 93 nM respectivamente.

La figura 6.2 muestra también las curvas y constantes de activación obtenidas para otros nucleótidos cíclicos. El activador específico de PKA, Sp-5,6-DCI-cBIMPS, previamente utilizado como facilitador de la memoria en *Chasmagnathus* (Romano et al 1996, b), mostró niveles totales de activación de PKA similares a los obtenidos con el activador endógeno AMPc, aunque con una afinidad menor y no mostró activación diferencial para ambas fracciones ( $K_a$  I/II= 510 nM ). La activación con el análogo MBC-cAMPS, mostró los mismos niveles máximos de activación y una leve afinidad diferencial entre fracciones, 77 nM vs 152 nM.

La combinación de análogos de AMPc ha sido documentada como herramienta para obtener la activación sinérgica de isoformas específicas de PKA (Skålhegg et al., 1992). Sobre la base de la afinidad de los análogos Sp-5,6-DCI-cBIMPS y MBC-cAMPS para los sitios de unión de AMPc en las subunidades regulatorias, una combinación de estos fue utilizada para activar de manera sinérgica la fracción II de PKA, y brindar una prueba adicional a la identificación de PKA II. Sin embargo, no se han encontrado diferencias ni efecto de activación sinérgica para ninguna de las dos fracciones de cangrejo (resultados no mostrados). Una explicación posible al respecto, es que el diseño de estas combinaciones de análogos es realizado considerando los datos de afinidad de los análogos por subunidades regulatorias de mamíferos, y es concebible que existan diferencias en la afinidad de las subunidades regulatorias de especies animales distanciadas evolutivamente.

Estas diferencias entre invertebrados y mamíferos resultan evidentes, por ejemplo, en el grado de sensibilidad de PKA al GMPc. Se ha descrito en insectos, que AMPc y GMPc poseen habilidades comparables en la activación de PKA (Altfelder & Müller, 1991). Esto sumado al hecho de que en tejidos de artrópodos, GMPc y AMPc se encuentran en niveles comparables en contraste con lo observado en mamíferos, donde GMPc es considerablemente mas bajo (Ishikawa et al., 1969), sugiere que en artrópodos existiría cierto grado de interacción entre estos dos segundos mensajero. En *Chasmagnathus* se evaluó

la sensibilidad de ambas isoformas de PKA al GMPc. Este nucleótido endógeno reveló un grado de activación máxima similar a la obtenida con AMPc y esta activación fue totalmente inhibida por PKI, lo que asegura que la actividad medida es específica de PKA. Las curvas para GMPc en la figura 6.2 muestran una leve diferencia en la sensibilidad de ambas isoformas al GMPc ( $K_a$  PKA I = 897 nM ;  $K_a$  PKA II = 1.9  $\mu$ M).

Estos resultados evidencian una importante diferencia en la sensibilidad de ambas fracciones de PKA por el activador endógeno, AMPc. En líneas generales, aunque no en forma tan marcada, PKA I mostró también mayor sensibilidad que PKA II para otros nucleótidos. Estos resultados constituyen una evidencia adicional para identificar a ambas fracciones como las respectivas isoformas de PKA, PKA I y II.

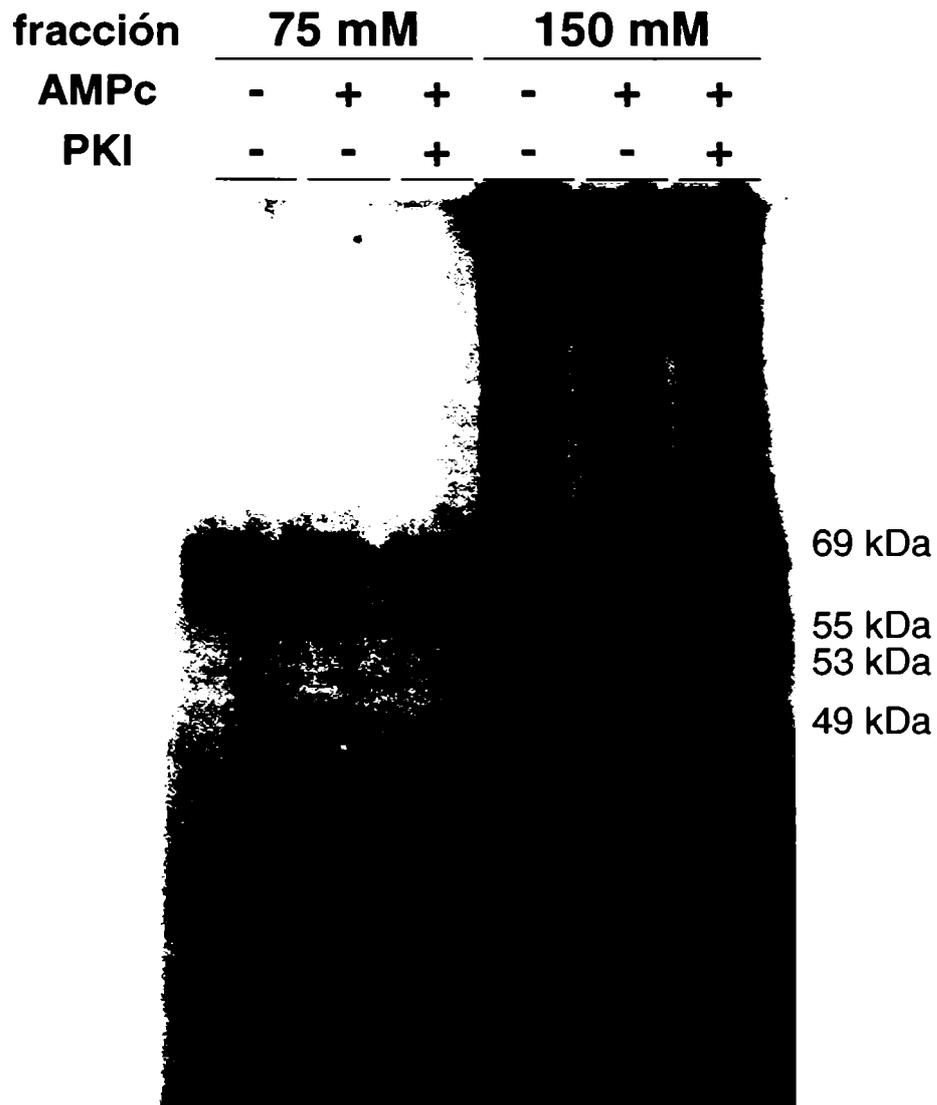
Los valores de sensibilidad de ambas isoformas de sistema nervioso de cangrejo, coinciden con reportes previos de la sensibilidad en tejido nervioso de mamíferos, los cuales revelan una mayor sensibilidad a las isoformas de PKA que contienen subunidades regulatorias de tipo I (Cadd et al., 1990).

### **6.3.3 Auto - fosforilación de PKA II**

La subunidad regulatoria de tipo II caracterizada en mamíferos e insectos sufre modificaciones tales como auto-fosforilación (Foster et al., 1984) o proteólisis parcial (Altfelder & Müller, 1989). Ambas modificaciones son tratadas como mecanismos regulatorios de la actividad de PKA, ya que ambas reducen la afinidad de la subunidad regulatoria por la subunidad catalítica prolongando el tiempo de activación de PKA incluso cuando el AMPc decae.

Los resultados previos en este capítulo, basados en los perfiles de elución y en la afinidad diferencial por AMPc, sugieren fuertemente que las dos fracciones eluidas de PKA corresponden a las dos isoformas I y II descritas en otros animales. Sin embargo, una posible interpretación alternativa de estos resultados es la presencia única de PKAII y que un producto de proteólisis de esta isoforma eluya a baja fuerza iónica siendo confundido con PKA I.

Por esto se realizó un experimento con un doble propósito, evaluar la capacidad de auto-fosforilación de PKA II y a su vez usar esta capacidad como un carácter diagnóstico para comprobar que las dos fracciones eluidas de PKA corresponden a las isoformas I y II, dado que de acuerdo a su caracterización en *Drosophila* la fracción de PKA II proteolizada no pierde la capacidad de autofosforilación.



**Figura 6.3 Autoradiografía del producto de autofosforilación de PKA.** Fosforilación de los substratos endógenos en las fracciones de PKA de ganglio supraesofágico eluidas a 75 y 150 mM. Las reacciones fueron realizadas en condición basal, estimulada con AMPc 10µM e inhibidas con PKI 2µM.

La figura 6.3 muestra una autoradiografía representativa de un gel de poliacrilamida en el que fueron separados los productos fosforilación en las dos fracciones sin el agregado del substrato exógeno. En la fracción eluida a alta sal (150 mM), varias proteínas incorporaron  $^{32}\text{P}$ . Solo dos de las bandas obtenidas probaron ser substrato de PKA ya que aumentan la incorporación de  $^{32}\text{P}$  con el agregado AMPc y muestran inhibición con el inhibidor de PKA, PKI. Una banda de 55 kDa, muestra un peso muy cercano a la subunidad regulatoria II caracterizada en insectos de 53 kDa (Inoue & Yoshioka, 1997), y podría corresponder a la forma fosforilada de esta subunidad regulatoria en cangrejo. Una banda menor con una masa de 43 kDa puede pertenecer a un producto de proteólisis de R II. Dos proteínas de 69 y 51 kDa corresponden a substratos de otras quinasas como lo prueban su independencia de AMPc y PKI, y coeluyen en la misma fracción. En la fracción eluida a 75 mM NaCl solo una banda muy suave aparece cuando se estimula con AMPc que probablemente corresponde a la misma banda de 43 kDa de la fracción de 150 mM. Esto sugiere que un producto de proteólisis de PKA II, eluye a una salinidad media entre ambas fracciones y comienza apareciendo como contaminación en la fracción eluida a 75 mM. De todos modos, la intensidad de la actividad de quinasa que revela la banda de 43 kDa eluida a 75 mM, no puede explicar por si sola la actividad medida en esta fracción en presencia del substrato exógeno Kemptide, lo que sugiere que en esta fracción existe un componente de actividad PKA que no se autofosforila y que corresponda entonces a PKA I.

## 6.4 Discusión

### 6.4.1 PKA I y PKA II en *Chasmagnathus*

De acuerdo al perfil de elución de una cromatografía de intercambio aniónico, se obtuvieron dos fracciones de actividad de PKA provenientes de extractos de tejido nervioso de *Chasmagnathus*. Distintas líneas de evidencias que consisten en caracteres distintivos de cada fracción, sugieren que estas dos fracciones corresponden a las dos principales isoformas de PKA identificadas ya en otros modelos, PKA I y PKA II: a) un perfil de elución con dos picos

similar al obtenido en tejidos de mamíferos (Corbin et al., 1975) ; **b)** mayor sensibilidad a nucleótidos cíclicos de la fracción que eluye a baja sal (Cadd et al., 1990) ; **c)** distribución diferencial de las dos fracciones en distinto tejidos; **d)** la capacidad de auto-fosforilación en la fracción que eluye a alta sal (Foster et al., 1984; Erlichman et al., 1974). De acuerdo a estas conclusiones este constituye el primer reporte de la identificación de isoformas de PKA en crustáceos.

Estas observaciones en cangrejo muestran diferencias y coincidencias con lo determinado para otros modelos de artrópodos en los cuales PKA ha sido estudiada en su relación con la formación de memoria. Mientras en cangrejo hemos hallado la presencia de al menos dos isoformas de PKA en sistema nervioso, en insectos, *Drosophila* y *Apis*, solo la isoforma II es detectable en individuos adultos (Foster et al., 1984; Müller, 1997). Hemos encontrado además en cangrejo proporciones diferenciales de cada isoforma en distintos tejidos. La presencia exclusiva de PKA II en protocerebro lateral, sumada a los resultados obtenidos en el capítulo IV que muestran un alto grado de actividad específica de PKA en esta estructura, sí resulta congruente con las observaciones en insectos. El protocerebro lateral es considerado como una estructura análoga y relacionada evolutivamente a los cuerpos pedunculados del cerebro de insectos (Hanström, 1947) en los cuales se ha determinado un alto grado de expresión de PKA II (Müller, 1997) como en este trabajo se lo ha hecho para el protocerebro lateral de cangrejo. El papel fundamental de la vía de PKA en los cuerpos pedunculados ha sido probado en procesos de aprendizaje olfatorio y memoria en insectos (Zars et al., 2000; Connoly et al., 1996) y resultaría de interés evaluar también esta función en el protocerebro lateral de cangrejos.

El hecho de que solo PKA I ha sido encontrada en branquias confirma la regulación tejido específica de la expresión de isoformas. Las branquias constituyen el principal órgano osmoregulador en crustáceos y son blanco de los osmorreguladores neuroendocrinos que estimulan la producción de AMPc. Se ha demostrado también que análogos de AMPc muestran efecto sobre la captación de Na<sup>+</sup> en branquias en crustáceo (Kamemoto, 1991). Los resultados en este capítulo muestran que la isoforma I de PKA mediaría estos efectos.

### 6.4.2 Activación de PKA por GMPc

La interacción entre las vías de GMPc y AMPc ha sido descrita en vertebrados e invertebrados. Uno de los niveles al cual esta interacción existe, es en la posibilidad de cada nucleótido active de manera inespecífica ambas quinasas, PKA y PKG. En particular, la activación de PKA por GMPc ha sido probada en levadura (Cytrinska et al., 1999) en insectos (Altfelder & Müller, 1991; Mane et al., 1985), nematodos (Vardanis et al., 1980) y en ratones (Schumacher et al., 1992). En esta tesis se da reporte de que en cangrejo, GMPc puede inducir una activación máxima de ambas isoformas de PKA similar a la inducida con AMPc aunque con una afinidad aproximadamente 10 veces menor. Sin embargo, el alto nivel de GMPc hallado en invertebrados, sugiere un posible papel de GMPc en la regulación de la activación endógena de PKA. En *Apis mellifera* se ha comprobado que la activación persistente de PKA en lóbulo antenal después de un entrenamiento, fundamental para la formación de una memoria olfatoria de largo término, es dependiente de ambos nucleótidos, AMPc y GMPc (Müller, 2000).

### 6.4.3 PKA I es más sensible a nucleótidos cíclicos que PKA II

En ratones se ha encontrado que las holoenzimas de PKA que contienen la subunidad regulatoria R I $\beta$  son más sensibles a AMPc (Cadd et al., 1990). La presencia de esta subunidad ha sido hallada restringida a cerebro y medula espinal, y se ha propuesto que su expresión podría estar vinculada con el aumento de la sensibilidad de las respuestas celulares mediadas por AMPc. En *Chasmagnathus* se ha determinado que la isoforma I de PKA expresada en sistema nervioso es aproximadamente 10 veces más sensible que la isoforma II. No resulta sorprendente, que la diferencia en el grado de sensibilidad entre isoformas resulte máximo para AMPc y menor para otros análogos sintéticos. Debe considerarse al respecto, que si existe una presión evolutiva para que el contraste de sensibilidad entre isoformas se conserve, es AMPc, el activador endógeno, para el cual estas diferencias son conservadas. Esto fortalece a su vez la idea de la importancia fisiológica de la existencia de isoformas con

sensibilidades distintas. De acuerdo con la sensibilidad diferencial entre isoformas, un aumento de la expresión o proporción de PKA I podría brindar a la célula umbrales inferiores de AMPc para inducir una respuesta o su vez permitir valores superiores de actividad basal de PKA aun en condiciones de reposo.

El conjunto de las características diferenciales de las dos isoformas de PKA identificadas en *Chasmagnathus*, tales como propiedades de activación, distribución tisular y subcelular específica y auto-fosforilación, plantea en relación con el interés central de esta tesis, una variedad de interrogantes relacionados con el posible papel diferencial de las isoformas en el proceso de plasticidad sináptica. En primer lugar, la participación diferencial de las isoformas brindaría un elemento de especificidad a la variedad de procesos regulados por PKA. Por otro lado, la regulación isoforma-específica de la expresión de PKA brinda la posibilidad de una proporción dinámica de isoformas, lo que agrega un elemento mas de plasticidad a la célula. Ambas posibilidades serán abordadas en el capítulo VII de esta tesis.



## **Capítulo VII**

### **Participación diferencial de las isoformas de PKA durante la consolidación de la memoria**



## 7.1 Introducción

A medida que el papel fundamental de PKA es demostrado en los más diversos modelos de memoria y plasticidad sináptica, resulta sorprendente y hasta a veces contradictorio que paradigmas de memoria y plasticidad divergentes, inducidos por patrones de estimulación distintos e incluso con resultados comportamentales o fisiológicos opuestos, resulten igualmente dependientes de esta vía de transducción. Los fenómenos de sensibilización y condicionamiento en *Aplysia*, estudiados tanto a nivel comportamental como sináptico, constituyen formas distintas de aprendizaje, no asociativa y asociativa respectivamente, son inducidos por patrones de estimulación distintos y sin embargo ambos resultan igualmente dependientes de PKA (Hawkins et al., 1983; Yovell et al., 1987). La adquisición y retención de memorias asociativa y no asociativas en *Drosophila* resultan también igualmente afectadas por mutaciones en esta vía de transducción (Corfas & Dudai, 1990; Dudai et al., 1986). En la abeja *Apis mellifera*, tanto un protocolo de estimulación que induce habituación de la respuesta de extensión de proboscis (Hildebrandt & Mueller, 1995) como un protocolo de condicionamiento olfatorio que aumenta la ocurrencia de la misma respuesta (Müller, 2000), inducen aumento persistente de la actividad de PKA en el lóbulo olfatorio. La potenciación y la depresión de largo término en hipocampo constituyen mecanismos de plasticidad sináptica diametralmente opuestos, requieren protocolos de inducción distintos y sin embargo ambos son dependientes de la actividad de PKA (Qi et al., 1996; Huang et al., 1995). Resulta intrigante, como un mecanismo regulatorio de acción tan generalizada como la actividad de PKA participa dirigiendo o induciendo de manera específica procesos distintos de una célula o circuito.

Una posibilidad que podría en parte resolver este interrogante la constituye la existencia de distintas isoformas de PKA. Como se ha desarrollado en la introducción general de esta tesis, y como se demuestra en el capítulo VI para *Chasmagnathus*, existen diversas isoformas de PKA que se diferencian por las subunidades regulatoria y catalítica que las conforman. Como ya se ha

discutido, las distintas afinidades de las subunidades regulatorias por el cAMP pueden conferir la a enzima distintas propiedades de activación (Cadd et al., 1990). A su vez la subunidad regulatoria puede dirigir y ubicar la enzima en dominios celulares específicos a través del pegado a proteínas de anclaje y de esa manera favorecer o permitir la fosforilación de substratos específicos en un pequeño ambiente celular (Faux & Scott, 1996; Schulman, 1995; Skálhegg & Tasken, 2000). Existen también isoformas de la subunidad catalítica que pueden conferir a la enzima afinidad por distintos substratos (Panchal et al., 1994). Sin embargo, a pesar del basto conocimiento existente sobre isoformas de PKA y del papel fundamental de esta enzima en procesos de plasticidad y memoria, poco se ha podido saber y aclarar hasta ahora acerca de posibles papeles diferenciales de las distintas isoformas y si el reclutamiento selectivo de isoformas contribuye a la especificidad que vincula un determinado patrón de estimulación con el cambio inducido.

Las estrategias farmacológicas utilizadas para probar el papel de PKA, carecen de la especificidad para bloquear o activar específicamente alguna de las isoformas (Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Müller, 2000). Si bien existen análogos de cAMP activadores o inhibidores de la enzima con afinidades diferenciales para las distintas isoformas de subunidades regulatorias o que utilizados en combinación muestran efecto sinérgicos sobre una determinada isoforma (Gjertsen et al., 1995; Van Sande et al., 1989; Beebe et al., 1984; Torgersen et al., 1997), resulta difícil trasladar estas propiedades para su utilización in vivo donde deben ser considerados problemas de dilución, permeabilidad y degradación diferencial de las drogas. Considerando estos factores no resulta fácil hallar dosis que aseguren la total activación o inhibición de una isoforma sin consecuencias sobre la actividad de otras.

Al igual que las estrategias farmacológicas, las determinaciones bioquímicas de activación de PKA carecen de la capacidad para resolver cual es la isoforma activada como consecuencia de una estimulación. Los trabajos previamente citados en los cuales se ha medido la activación de PKA asociada a la formación de memoria o de plasticidad neuronal (Bernabeu et al., 1997;

Roberson & Sweatt, 1996; Müller, 2000; Müller & Carew, 1998) como los presentados en esta tesis en los que se mide activación de PKA inducida por entrenamiento o exposición al contexto (Capítulo V) no sirven para determinar que isoforma de PKA se encuentra activa o si son ambas.

Por el contrario, las estrategias genéticas sí han permitido determinar en hipocampo de ratones dependencia que algunas formas de plasticidad sináptica poseen de determinadas isoformas de la subunidad reguladora de PKA:

- En hipocampo de ratones carentes de la subunidad **R1 $\beta$**  se pierde la capacidad de inducir depresión de largo término (LTD) en la vía colateral de Schaffer y en Giro Dentado, pero muestran una potenciación de largo término (LTP) normal en la misma zona, a pesar de que ambos mecanismos son igualmente dependientes de PKA (Brandon et al., 1995). Este resultado sugiere que distintas isoformas de PKA estarían involucradas en distintas formas de plasticidad; la potenciación sería independiente de la subunidad **R1 $\beta$**  y en cambio esta isoforma sería fundamental para la inducción de la depresión sináptica.
- Los mismos ratones carentes de **R1 $\beta$**  que muestran LTP normal en la vía perforante, carecen de LTP en las fibras musgosas donde la inducción de LTP requiere mecanismos distintos a los de la vía perforante, pre-sinápticos e independiente del receptor NMDA, aunque también dependiente de PKA (Huang et al., 1995). LTP asociativo inducido en la vía perforante requiere una isoforma de PKA distinta a la del LTP no asociativo en las fibras musgosas. En este ejemplo se evidencia que fenómenos semejantes pero con requerimientos distintos de inducción involucran diferentes isoformas PKA.
- Se ha reportado recientemente otro trabajo donde se muestra la inducción de LTP en la vía perforante mediante dos formas alternativas de estimulación, aunque en ambos casos dependientes de PKA. En dicho trabajo ratones transgénicos que expresan una subunidad reguladora no estimulable de PKA y en consecuencia tienen solo un 50% de los valores

normales de actividad PKA, no muestran LTP cuando este es inducido por uno de los métodos y sin embargo el LTP es normal si es inducido por el método alternativo. En este caso se demuestra que incluso el fenómeno de LTP inducido en las mismas neuronas pero por distintos patrones de actividad recluta diferentes isoformas de PKA ( Woo et al., 2000 ).

Los antecedentes en invertebrados acerca del papel específico de isoformas de PKA en la formación de memoria resultan indirectos. En *Drosophila* y en la abeja *Apis mellifera*, la expresión predominante de PKA II en los cuerpos pedunculados, ha llevado a sugerir un papel fundamental de esta isoforma en los mecanismos de formación de la memoria (Müller, 1997). R II, la subunidad regulatoria de PKA II, y no R I, es susceptible de autofosforilación (Foster et al., 1984) y también propensa de sufrir modificación por proteólisis una vez activa (Müller & Spatz, 1989). Ambas modificaciones retardan la reasociación de las subunidades regulatorias y catalíticas prolongando la actividad de PKA luego de la estimulación, incluso cuando los niveles de cAMP retornan a valores basales. Estas características han llevado a vincular en insectos a PKA II con procesos de memoria también sobre la base de sus características de activación (Aszodi et al, 1991; Buxbaum & Dudai, 1989), dado que la activación persistente de PKA constituye una característica prácticamente generalizada de las estimulaciones que inducen memoria de largo término (Kandel & Schwartz, 1982; Schwartz & Greenberg, 1987; Bernabeu et al., 1997; Müller & Carew, 1998; Müller, 2000) y que sus características de activación constituyen un correlato bioquímico de memoria. A pesar de estas características que sugieren el papel fundamental de PKA II, la única evidencia concreta del papel de una isoforma en aprendizaje y memoria en invertebrados lo constituye el trabajo de Goodwin et al., 1997, en el cual moscas *Drosophila* con disrupción genética de la subunidad RI muestran deficiencias en aprendizaje olfatorio. Este resultado sugiere fuertemente un papel fundamental de esta isoforma en aprendizaje en *Drosophila*, sin embargo esta conclusión resulta confusa visto que la subunidad R I solo se encuentra en estadios larvales y no en adultos de *Drosophila* (Foster, 1984; Müller & Spatz, 1989; Altfelder & Muller; 1991) mientras otros trabajos sugieren una muy baja

expresión de esta proteína en individuos adultos (Inoue & Yoshioka, 1997) o documentan solo la presencia del transcripto en todos los estadios (Kalderon & Rubin, 1988). Estos resultados controversiales conducen a diferentes interpretaciones de los resultados de Goodwin y colaboradores: La expresión de esta subunidad es inducida por el aprendizaje y resulta indispensable para la formación de memoria, o bien existe un deterioro de las capacidades mnésicas producto de la falta de la proteína R I durante el desarrollo, período durante el cual dicha proteína sí ha sido encontrada en individuos normales.

En el modelo de facilitación pre-sináptica en *Aplysia*, mecanismo celular que subyace la sensibilización, se han estudiado en detalle los mecanismos responsables de la activación persistente de PKA observada durante la facilitación de mediano y largo término (Greenberg et al, 1987; Müller & Carew, 1998). Se ha comprobado que la activación persistente de PKA se debe a una disminución coordinada de las subunidades regulatorias (Bergold et al, 1992) y que esta disminución no se debe a un descenso en la transcripción de las subunidades R, sino a un aumento de la actividad proteolítica a su vez dependiente de síntesis proteica (Bergold et al, 1990) y mediado por el sistema ubiquitina-proteosoma (Hegde et al., 1993; Chain et al., 1995; Hegde et al., 1997; Chain et al., 1999). Se han detectado en tejido nervioso de *Aplysia* al menos 5 isoformas de subunidad regulatoria homologas a las isoformas I y II (Palazzolo et al, 1989). Sin embargo no existe hasta el momento un estudio detallado sobre un papel diferencial de las isoformas de PKA y si participan de manera diferencial en los distintos estadios de facilitación de corto, mediano y largo término.

De los antecedentes mencionados resulta evidente la vinculación específica de distintas isoformas de PKA con la inducción de distintos fenómenos de plasticidad sináptica en hipocampo. Sin embargo no existen hasta ahora evidencias claras y directas de la participación específica o de papeles diferenciales de las distintas isoformas de PKA durante un proceso de formación de memoria o plasticidad a nivel del comportamiento.

En el capítulo III de esta tesis se ha demostrado de manera farmacológica que la consolidación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus* muestra al

menos dos periodos de dependencia de la actividad de PKA. En el capítulo V se ha comprobado que durante los periodos de dependencia existe un aumento neto de la actividad PKA y también que la sola exposición al contexto induce aumento de actividad PKA. En el capítulo VI se comprobó en sistema nervioso de cangrejo la existencia de las isoformas I y II de PKA con características bioquímicas y de activación distintas. El objetivo de este capítulo fue determinar si las isoformas I y II de PKA participan diferencialmente en el proceso de consolidación de la memoria. Habiendo comprobado que tanto el entrenamiento como la exposición al contexto inducen aumentos similares en la actividad de PKA se buscó en este capítulo si existe una vinculación específica y diferencial entre las isoformas y las distintas experiencias.

Por otro lado se estudiaron los posibles mecanismos responsables del aumento de la actividad de PKA seis horas después del entrenamiento. El hallazgo de una segunda ventana temporal de dependencia de PKA para la consolidación de la memoria se ha repetido en diversos modelos y resultan intrigantes los mecanismos regulatorios que promueven la activación de PKA horas después de que el aumento de AMPc inducido por la estimulación ha cesado. El mecanismo que subyace la actividad sustentable de PKA durante la consolidación de la facilitación en *Aplysia* es la degradación de la subunidad regulatoria de la enzima (Chain et al., 1999) por un sistema proteolítico inducido por la propia activación de PKA (Hegde et al., 1997). En el modelo de aprendizaje de la abeja *Apis mellifera*, se sabe que la actividad persistente de PKA es dependiente de una señal inicial de óxido nítrico que activa guanilato ciclasa (Müller, 2000). En mamíferos en cambio se ha visto que un segundo periodo de aumento en la actividad de PKA coincide con aumento del AMPc mediado por los receptores dopaminérgicos D1/D5 (Bernabeu et al., 1997). Aparentemente, los mecanismos que subyacen la activación tardía de PKA en procesos de memoria no están conservados en los modelos estudiados. Considerando el aumento en la actividad total de PKA que nosotros hemos hallado en cangrejos seis horas después del entrenamiento, y teniendo en cuenta la existencia de distintas isoformas de PKA con distintas sensibilidades

por el AMPc, se estudió en este capítulo la posibilidad de que cambios en los niveles o proporción de isoformas estén relacionados con distintos niveles de actividad basal de PKA en las células durante la fase tardía del proceso de consolidación.

## **7.2 Materiales y Métodos**

### **7.2.1 Tratamientos**

Al igual que en el capítulo V se trabajó con animales de tres condiciones distintas: Animales entrenados (ENT), animales solo ubicados en el contexto de entrenamiento (CTX) y animales naive (NV); y para cada tratamiento se trabajó a tres tiempos distintos respecto de la experiencia: inmediatamente después de la experiencia, 6 horas y 24 horas después (ver figura de protocolo 7.1). Considerando el aspecto dinámico de las variables que se midieron, se procuró reducir al máximo las posibles diferencias entre individuos previas al experimento. Para esto, los animales asignados a cada tratamiento fueron siempre realizadas con animales provenientes del mismo lote y que por lo menos en los dos días previos al experimento no habían recibido estimulación ni manipulación alguna. Para mas detalles, consultar materiales y métodos del capítulo V.

### **7.2.2 Extractos**

Existen algunas diferencias fundamentales entre los extractos utilizados en este capítulo y los utilizados en el capítulo V para medir cambios en la actividad de PKA inducida por el entrenamiento. La medición de actividad de PKA del capítulo V fué realizada siempre con extractos provenientes de un animal. En cambio, las muestras utilizadas en este caso provenían de un conjunto de 10 animales. Dado que el factor temporal desde finalizado el tratamiento resulta determinante en las variables que se midieron, para junta

las muestra de diez animales se resolvió trabajar individualmente con cada animal hasta tener el ganglio supraesofágico del mismo congelado en nitrógeno líquido y de este modo evitar variaciones del orden de minutos entre animales. Estrictamente al tiempo indicado cada animal era enfriado en agua con hielo durante dos minutos y luego rápidamente se extraía el ganglio supraesofágico que era congelado rápidamente colocándolo en un tubo tipo "Eppendorf" sumergido en nitrógeno líquido. Los 10 ganglios eran luego descongelados con 1 ml de: Tris 50mM pH 7,5; EDTA 5mM; EGTA 2mM e inhibidores de proteasas: 1ugr/ml Pepstatin A, 10ugr/ml Leupeptin, 0.25mM PMSF, 10ugr/ml Aprotinin y homogenizados con un homogenizador vidrio-vidrio. El homogenato era centrifugado 5min a 10000 RPM. Una alícuota del sobrenadante era utilizada para cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford y el resto del sobrenadante era nuevamente congelado en nitrógeno hasta el momento de la separación de isoformas de PKA mediante cromatografía de intercambio aniónico.

### **7.2.3 Cromatografía de intercambio aniónico**

La cromatografía de intercambio aniónico para separación de las isoformas I y II de PKA fue realizada con resina DE-52 de Wahtman equilibrada con buffer Tris 50mM pH 7,5. Las columnas empaquetadas tenían un volumen de 0.25 ml armadas dentro de jeringas plásticas de 1ml. Con el propósito de optimizar la retención de la muestra en la columna durante el cargado y debido a que la holoenzima I de PKA eluye a baja fuerza iónica, se diluía la muestra con buffer de homogenización aumentando varias veces su volumen. Dicha dilución de la muestra hizo imposible determinar la presencia de una fracción enzimática eluida en el percolado de la columna, sin embargo no representa un problema para determinar la actividad enzimática retenida en la columna, ya que cuando se realiza la elución a fuerza iónica creciente la muestra se concentra nuevamente proporcionalmente a la velocidad del aumento de la fuerza iónica. La cantidad de proteínas pasada por la columna era previamente igualada entre tratamientos dentro del mismo experimento y entre experimentos varió entre 1 y 1,5 mgr. Una vez cargada la muestra en la columna, ésta era lavada

con un flujo continuo de 5 ml de Tris 50mM pH7.5 y la elución era realizada en pasos de 0.5 ml con saltos discretos de 12.5mM en la concentración de NaCl desde 0 hasta 240mM en Tris 50mM pH 7.5 y 15% glicerol. El cargado, lavado y elución de la columna fueron realizados a una velocidad constante de 0.5 ml/minutos mediante el uso de una bomba peristáltica de flujo controlado y todo el proceso fue realizado a 4°C. Las fracciones eluidas de 0.5 ml eran fraccionadas en alícuotas de 0.1ml e inmediatamente congeladas y guardadas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

#### **7.2.4 Ensayo de Fosforilación**

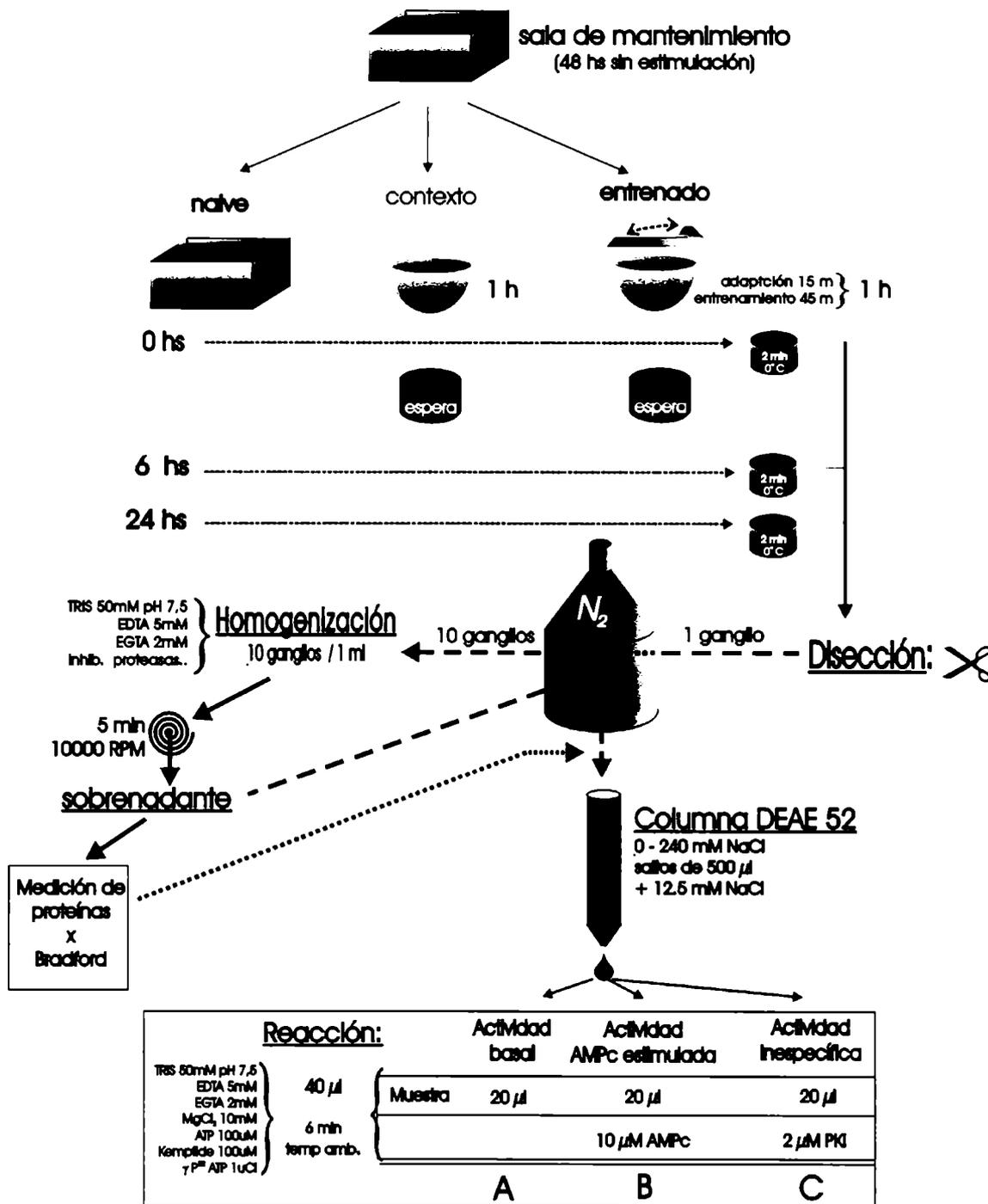
El ensayo de fosforilación se realizó en un volumen final de reacción de 40ul, compuestos por 20 µl de muestra y 20 µl de solución de reacción para obtener una concentración final de: 50mM TRIS pH7.5, 5mM EDTA, 2mM EGTA, 100µM ATP, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1µCi <sup>32</sup>P-ATP y 50µM del substrato específico de PKA, Kemptide, y en presencia de 10 µM de cAMP o inhibidor específico de PKA, PKI. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado y fueron considerados los promedios.

La reacción duraba 6 minutos a temperatura ambiente y cumplido el tiempo, 30µl de la misma eran sembrados sobre papel de fosfocelulosa (Whatman P81). El lavado del fosfato no incorporado y cuantificación de la actividad fue realizado de acuerdo a lo indicado en el capítulo IV.

La actividad total de PKA en cada fracción eluida fue calculada restando la actividad medida en presencia del inhibidor específico de PKA, PKI.

La figura 7.1 resume el protocolo desde el tratamiento que recibieron los animales hasta la determinación de las isoformas.

**Figura 7.1**  
**Protocolo para determinación de niveles de isoformas de PKA**



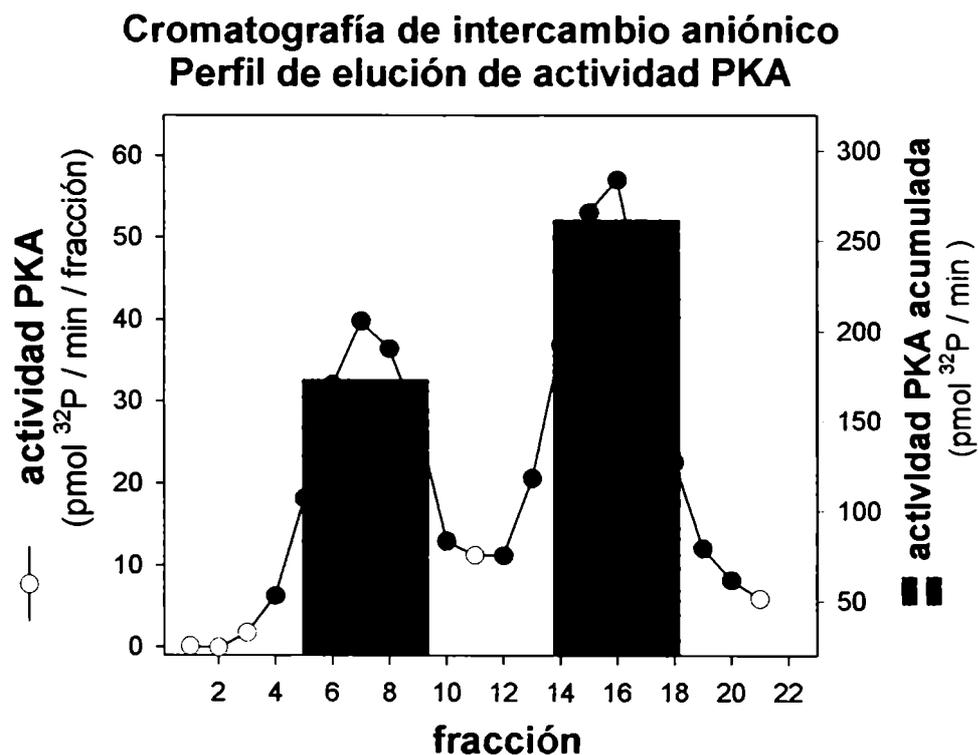
Actividad basal de PKA = (A - C)

Actividad total de PKA = (B - C)

### 7.2.5 Cantidad de cada Isoforma

Para calcular la proporción de las holoenzimas de PKA I y II en los extractos de animales sometidos a distintos tratamientos, se cargaban todas las columnas con la misma cantidad de proteína. Una vez eluida las columnas se medía actividad PKA en las fracciones y aprovechando que los picos de actividad eluida para PKA I y II se separan claramente durante la elución, se integró la actividad de todas las fracciones dentro de cada pico para estimar la cantidad de cada holoenzima en el extracto.

La figura 7.2 ejemplifica el perfil de elución de actividad PKA de ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus* de una columna de intercambio aniónico y las barras muestran la actividad integrada correspondiente a PKA I y PKA II.



**Figura 7.2 Perfil representativo de la elución de la actividad de PKA I y II, y actividad integrada de cada isoforma.** La figura muestra la elución de PKA revelada por medición de la actividad fosfotransferasa en cada fracción. La especificidad de PKA estuvo controlada por el uso del sustrato específico, Kempitide, la estimulación con AMPc e inhibición con PKI. La actividad integrada se calculó sumando la actividad medida dentro de cada pico indicado por los círculos llenos. Verde: PKA I ; Azul: PKA II.

## 7.3 Resultados

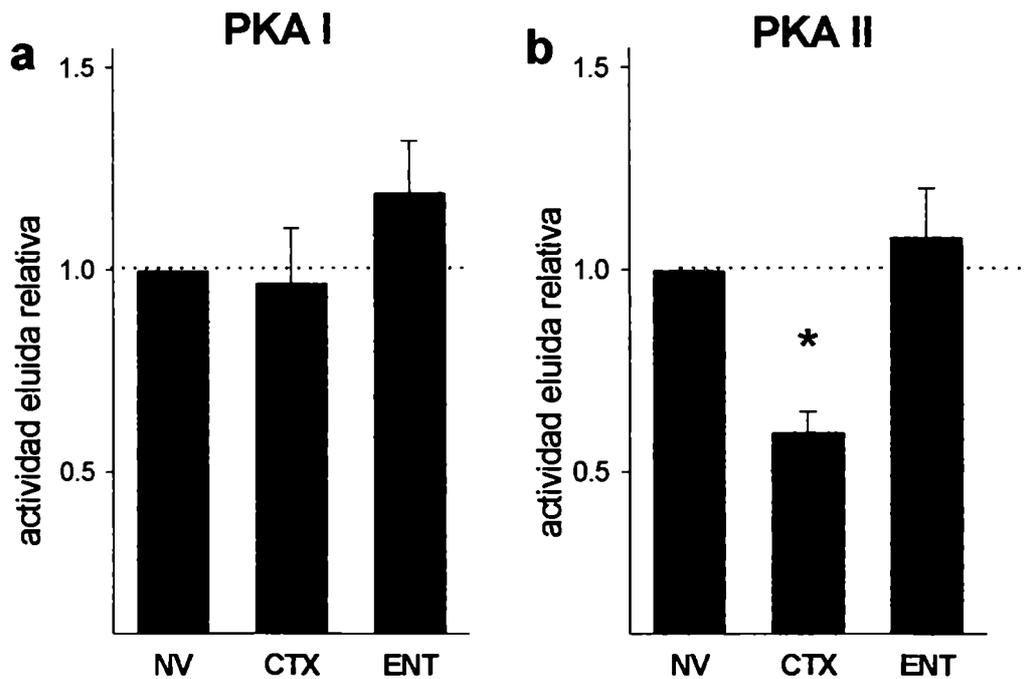
### 7.3.1 La exposición al contexto de entrenamiento induce activación de la isoforma II de PKA inmediatamente después de la experiencia

En el capítulo V se ha determinado un aumento en la actividad basal de PKA en ganglio supraesofágico inmediatamente después de entrenar o simplemente presentar a los animales el contexto del entrenamiento. **El objetivo de los siguientes experimentos fue estudiar el papel de las isoformas I y II de PKA en la activación inducida por ambas experiencias. Esto permitiría determinar si las activaciones de PKA inducidas por distintas experiencias poseen una identidad mecanística propia.**

Las isoformas de PKA y sus subunidades disociadas poseen propiedades iónicas lo suficientemente divergentes para ser cuantificadas luego de su separación en una columna de intercambio aniónico (Schwartz & Rubin, 1983). Las holoenzimas de PKA se adhieren a la resina de intercambio aniónico por medio de la subunidad regulatoria, por lo que las subunidades catalíticas libres no son retenidas en una columna de intercambio aniónico. Dado que PKA se activa cuando la holoenzima se disocia, la activación de la misma puede ser vista de manera indirecta como una disminución en la actividad de PKA retenida en una columna de intercambio aniónico (Chew, 1985). Sin embargo debe tenerse en cuenta que los niveles endógenos de activación, dependen de equilibrios rápidos de disociación y reasociación de la holoenzima. La estabilidad de este equilibrio, puede variar dependiendo de las condiciones de extracción, de las isoformas involucradas, de la concentración de AMPc y de modificaciones en R que resten afinidad por C. Dado que el tiempo requerido para preparación del extracto y cargado de la columna, y las condiciones de fuerza iónica utilizadas en este capítulo no pueden igualar las condiciones del capítulo V para medir de manera directa la actividad de PKA, podría esperarse que el grado de asociación de las holoenzimas eluidas de las columnas de

intercambio aniónico no reflejen el grado de activación encontrado en dicho capítulo.

Se sometieron a separación en columnas de intercambio aniónico extractos citosólicos de ganglio supraesofágico provenientes de animales naive, animales expuestos al contexto y animales entrenados. Luego de eluir la columna de intercambio aniónico se midió actividad PKA para revelar la presencia de la enzima en las fracciones. Se midió la actividad de fosfotransferencia con agregado de  $10\mu\text{M}$  cAMP a lo largo de toda la elución y se integró la actividad en el 1er y 2do pico de actividad como las actividades de PKA I y II respectivamente (ver figura 7.2). Una vez determinadas las fracciones con actividad de fosforilación, la reacción se repetía solo en esas fracciones pero con agregado de  $2\mu\text{M}$  de PKI para determinar la actividad específica de PKA y con o sin  $10\mu\text{M}$  de cAMP para determinar la dependencia de AMPc de la actividad medida y asegurarse la presencia de holoenzimas y no de subunidades catalíticas libres. En todos los casos se comprobó que la actividad en los picos se debía a holoenzimas de PKA ya que era completamente dependiente AMPc. Los gráficos de barras de la figura 7.3 constituyen los promedios de 4 réplicas independientes del experimento y muestran la actividad de PKA correspondientes a PKA I y II inmediatamente después del tratamiento. La figura 7.3a muestra que ningún tratamiento induce diferencias en la actividad eluida correspondiente a PKA I. Se realizó un ANOVA de 4 bloques, tomando como bloque cada réplica del experimento que era realizada con un nuevo lote de animales y en cada bloque estaban representados todos los tratamientos; factor tratamiento no significativo  $F_{2,6} = 2.22$ . El gráfico 7.3.b en cambio sí muestra diferencias significativas entre tratamientos para los niveles de actividad eluida correspondiente a PKA II (Anova de bloques; factor tratamiento:  $F_{2,6} = 10.70$ ;  $p < 0.01$ ). La actividad eluida de PKAII en animales expuestos al contexto resulta significativamente menor que la de animales naive o entrenados. Contrastes Tuckey, muestran diferencias significativas entre los grupos naive y contexto,  $Q = 5.69$ ,  $p < 0.025$  y entre los grupos entrenado y contexto  $Q = 5.63$ ;  $p < 0.025$ .



**Figura 7.3: Actividad correspondiente a PKA I y II en ganglio supraesofágico inmediatamente después del entrenamiento.** La actividad está expresada normalizada a la actividad medida en los animales naive. Los resultados representan media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. En cada repetición se realizaron los tres tratamientos y las comparaciones estuvieron basadas en un ANOVA de bloques considerando cada repetición realizada con un nuevo lote de animales como bloque.

Anova : PKA I ;  $F_{2,6} = 2.22$  NS; PKA II :  $F_{2,6} = 10.70$ ;  $p < 0.01$ .

Contrastes Tuckey (PKA I): NV vs CTX:  $Q = 5.69$ ,  $p < 0.025$  y ENT vs CTX :  $Q = 5.63$ ,  $p < 0.025$ .

De esta manera, los resultados de esta sección muestran una disminución en la actividad de PKA II retenida en la columna realizada con extractos de animales expuestos al contexto. Dado que en el capítulo V se ha determinado que inmediatamente después de la exposición al contexto existe un aumento en la actividad basal de PKA y que la actividad total se mantiene constante, debemos asumir a la disminución en PKA II como una fracción de la misma en estado disociado. La dilución de la muestra, previa al cargado de la columna impidió la cuantificación de la actividad de PKA eluida en el percolado y por lo tanto no permitió determinar si la disminución en la cantidad de la holoenzima II se reflejaba como un aumento en la cantidad de subunidad catalítica libre no retenida en la columna. De todos modos podemos asumir que el aumento de

actividad basal de PKA observado inmediatamente después de la exposición al contexto de entrenamiento se debe a la activación de la isoforma II de PKA.

Los animales entrenados no muestran un cambio significativo en el perfil de elución respecto a los animales naive a pesar de que en el capítulo V se ha demostrado que el entrenamiento provoca una activación de PKA similar a la inducida por la exposición al contexto. Posiblemente las diferencias metodológicas incorporadas en el presente capítulo respecto del capítulo V, no prevengan la reasociación de las subunidades de PKA en el caso de la activación inducida por el entrenamiento. Estas diferencias permiten concluir que los mecanismos responsables del aumento de actividad basal de PKA son distintos en animales entrenados y animales expuestos al contexto.

### **7.3.2 Incremento en la isoforma I de PKA 6 horas después del entrenamiento**

Se ha demostrado en los capítulos previos que la consolidación de la memoria de largo término inducida por el entrenamiento es dependiente de la actividad de PKA en una ventana temporal varias horas después del entrenamiento (capítulo III) y que existe una modulación positiva y aumento neto de la actividad basal y total de PKA durante este período (capítulo V).

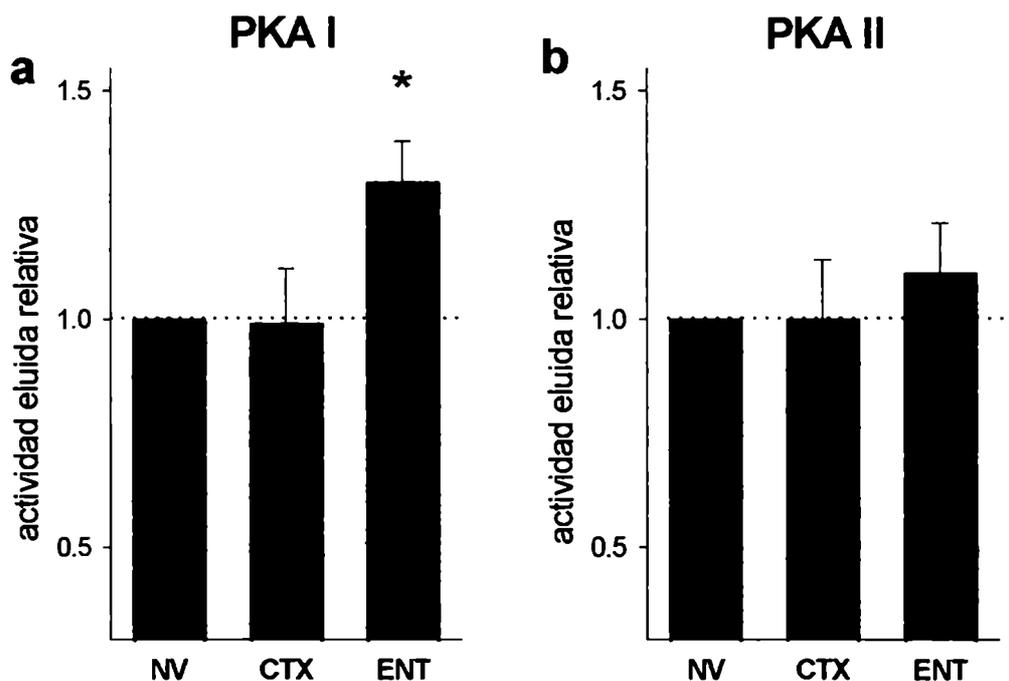
El aumento en la actividad total de PKA en *Chasmagnathus* seis horas después del entrenamiento nos ha llevado a plantear la siguiente pregunta: Dada la expresión de al menos dos isoformas de PKA en el sistema nervioso de *Chasmagnathus* con distintas sensibilidades al AMPc; ¿Podría un aumento en la expresión de la isoforma de PKA más sensible al AMPc ser responsable del aumento en la actividad basal de PKA? Un cambio de esta naturaleza, podría bajar los umbrales de activación de la célula y permitir una actividad basal más alta a niveles normales de AMPc (Cadd et al., 1990).

**El objetivo del siguiente experimento fue determinar cual es la isoforma de PKA involucrada en el aumento de actividad total y basal de PKA**

**observado durante el segundo período de dependencia de PKA para la consolidación.**

Se procedió de manera similar al experimento anterior, con la diferencia que los animales entrenados o expuestos al contexto fueron dejados 6 horas en reposo luego de finalizado el tratamiento y antes de ser sacrificados. Los animales naive, provenientes del mismo lote que los animales entrenados y contexto, fueron sacrificados en el mismo momento de los tratados para evitar diferencias dependientes de horario, ya que podría existir una oscilación circadiana de las variables medidas.

La figura 7.4 muestra los resultados de la actividad de PKA correspondientes a las holoenzimas I y II de PKA luego de separación por cromatografía de intercambio aniónico de extractos citosólicos de ganglio supraesofágico.



**Figura 7.4: Actividad correspondiente a PKA I y II en ganglio supraesofágico 6 horas después del entrenamiento.** La actividad está expresada normalizada a la actividad medida en los animales naive. Los resultados representan media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. En cada repetición se realizaron los tres tratamientos y las comparaciones estuvieron basadas en un ANOVA de bloques considerando cada repetición realizada con un nuevo lote de animales como bloque.  
 Anova : PKA I ;  $F_{2,6} = 6.34$   $p < 0.05$ ; PKA II :  $F_{2,6} = 0.69$ ; NS  
 Contrastes Tuckey (PKA II): NV vs ENT:  $Q = 4.40$ ,  $p < 0.05$  y CTX vs ENT :  $Q = 4.31$ ,  $p < 0.05$ .

En la figura 7.4.a se pueden observar diferencias en la cantidad de holoenzima I para los distintos tratamientos. Se realizó un ANOVA de 4 bloques; tomando como bloque cada repetición del experimento en el cual los tres tratamientos estaban representados; factor tratamiento significativo,  $F_{2,6} = 6.34$ ;  $p < 0.05$ . Los animales entrenados muestran un aumento significativo de un 30% en la cantidad eluida de la holoenzima I respecto de animales naive, contrastes Tuckey  $Q = 4.40$ ;  $p < 0.05$  y respecto de los animales expuestos al contexto  $Q = 4.31$   $p = 0.05$ .

No se observaron cambios para la cantidad de la isoforma II (Anova de bloques; factor tratamiento:  $F_{2,6} = 0.69$ ).

De acuerdo a la hipótesis se ha encontrado en los animales entrenados un aumento neto en la cantidad de la isoforma I respecto de los animales naive. Este aumento no se ve acompañado por una disminución compensatoria en la cantidad de isoforma II, observación que resulta congruente con el aumento neto en la cantidad total de PKA observado 6 horas después del entrenamiento en el capítulo V. Por lo tanto el aumento en la actividad basal y total de PKA observado durante el segundo periodo de dependencia de PKA para la consolidación, se debe a un incremento en la cantidad de la isoforma I de PKA. Los animales expuestos al contexto no muestran cambio en la proporción de las isoformas respecto de los animales naive.

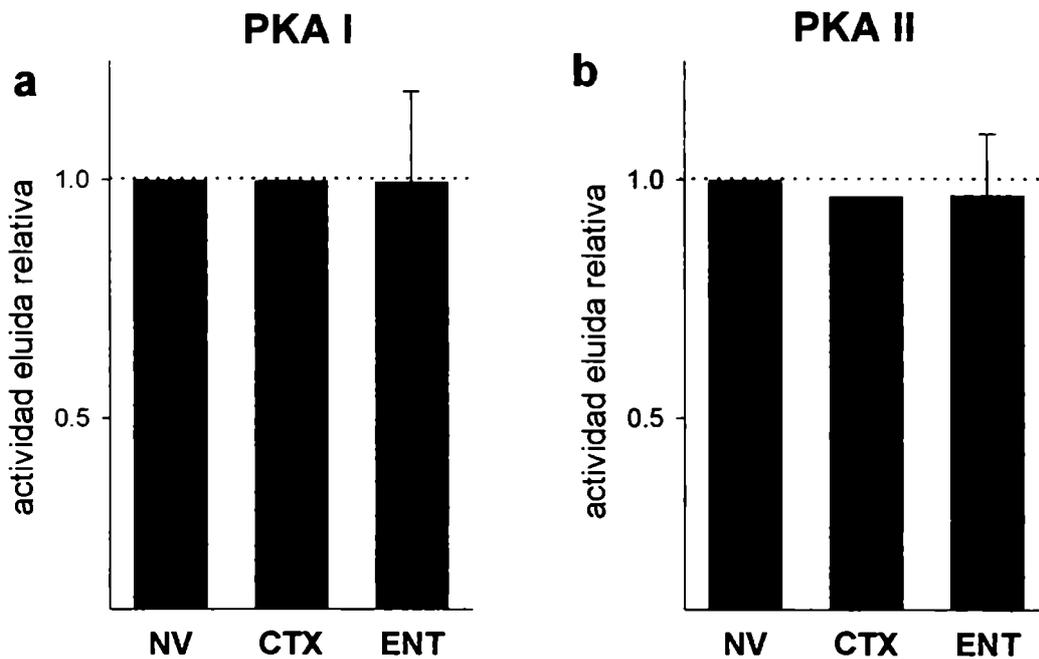
### **7.3.3 24 horas después del tratamiento se reestablecen las proporciones de holoenzima I y II de PKA**

Se ha determinado en el capítulo III, que la inhibición de PKA durante la sesión de evaluación no afecta la evocación de la memoria 24 horas después del entrenamiento, y en el capítulo V, que a dicho tiempo no se observa un aumento de la actividad de PKA. Sin embargo, a la luz de los resultados en este capítulo, donde se observa un cambio en la cantidad de la isoforma I de PKA como mecanismo celular involucrado en la consolidación, surge la hipótesis de que cambios en las proporciones de las isoformas de PKA

participen como mecanismo en el mantenimiento de la memoria de largo término.

**El objetivo de esta sección fue evaluar si existen cambios en las proporciones las isoformas I y II de PKA 24 horas después del entrenamiento.**

Del mismo modo que en las secciones anteriores, se sometieron a separación en columnas de intercambio aniónico extractos de ganglios supraesofágico de animales naive, entrenados y expuestos al contexto. Esta vez los animales fueron dejados en reposo 24 horas entre la finalización del tratamiento y la disección de los ganglios. La figura 7.5 muestra la actividad eluida correspondiente a PKA I y II para los tres tratamientos. El experimento fue repetido 2 veces de manera independiente y con distintos lotes de animales y no fueron encontradas tendencias del cambio.



**Figura 7.5 Actividad correspondiente a PKA I y II en ganglio supraesofágico 24 horas después del entrenamiento.** La actividad está expresada normalizada a la actividad medida en los animales naive. Los resultados representan media  $\pm$  ES de 2 experimentos independientes. En cada repetición se realizaron los tres tratamientos.

## 7.4 Discusión

En los capítulos anteriores se estudió la dependencia y la activación de la PKA durante el proceso de consolidación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus* (capítulos III y V). En este capítulo el análisis se extendió al papel de las isoformas I y II de PKA durante los dos períodos de dependencia de esta enzima para la consolidación. Dado que la farmacología y la medición directa de la activación no permiten distinguir la participación de isoformas, la estrategia de este capítulo se basó en que la activación de PKA es directamente dependiente de la disociación de la holoenzima y en que las subunidades libres y las holoenzima I y II son diferencialmente retenidas en una columna de intercambio aniónico. Si bien la estrategia utilizada no brinda una medida directa de la activación de las distintas isoformas, permite un análisis cualitativo de la composición de isoformas en el tejido y refleja el estado de asociación o disociación de las holoenzimas.

Este estudio permitió establecer que son mecanismos diferentes los que subyacen la activación de PKA observada luego de experiencias distintas tales como la exposición al contexto y el entrenamiento. Estos resultados sumados a los del capítulo V, que revelan distinto patrón temporal de activación para cada experiencia, muestran que la activación de PKA inducida por la exposición al contexto y por el entrenamiento tienen identidad mecánica propia.

### 7.4.1 Mecanismos distintos subyacen la activación de PKA inducida por el entrenamiento y por el contexto

Los extractos de ganglio supraesofágico de los animales que fueron expuestos al contexto durante 50 minutos muestran en comparación con animales naive una disminución en la cantidad de PKA tipo II retenida en la columna de intercambio aniónico (figura 7.3). Dicha disminución coincide con un aumento de la actividad basal de PKA, sin aumento ni disminución de la actividad total (capítulo V). Dado que la activación de PKA depende de la disociación de la holoenzima, y que la resina de intercambio aniónico no retiene a la subunidad catalítica libre, la disminución de la actividad de PKA II retenida en la columna

debe ser interpretada como la activación de dicha isoforma. La fracción de subunidad catalítica libre responsable del aumento en la actividad basal se considera que eluyó en el percolado de la columna, que no pudo ser medido en estos experimentos por la dilución realizada para el cargado de la misma. Otra explicación posible, considera un comportamiento ya reportado de la subunidad catalítica libre, de asociarse a la fracción particular de extractos realizados en condiciones de baja sal (Chew, 1985), similar a la condición que debió usarse en estos experimentos para permitir el pegado de las holoenzimas a la resina de intercambio aniónico. La fracción particular, fue descartada en el paso de centrifugado previo al cargado de la columna, posiblemente junto con las subunidades catalíticas libres. Dicha fracción particular sí se hallaba presente en los ensayos de medición de actividad PKA del capítulo V, ya que el paso de centrifugado no era realizado.

Ambas interpretaciones, la falta de retención de la subunidad catalítica libre en la columna o la traslocación de la subunidad catalítica a la fracción particular se explican por la disociación de la holoenzima. Basándonos en estas consideraciones, podemos concluir que la sola exposición al contexto de entrenamiento, que en este caso constituye un ambiente nuevo, induce la activación de la isoforma II de PKA en ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus*.

En el capítulo V, se ha demostrado que los animales entrenados muestran aumento en la actividad basal de PKA en ganglio supraesofágico después de la experiencia, al igual que los animales expuestos al contexto. Sin embargo, esta activación no se refleja en las columnas de intercambio aniónico como la disminución de alguna de las holoenzimas. Esta diferencia entre la activación observada en animales contexto y entrenados, indica que son mecanismos distintos los responsables de ambas activaciones. A continuación se discutirán posibles mecanismos responsables de estas diferencias:

#### **7.4.1.1 Isoformas I y II de PKA**

En la interpretación de las diferencias entre la activación de PKA inducida por el contexto y por el entrenamiento, deben ser consideradas la participación de

distintas isoformas de PKA, sus propiedades divergentes de activación y las diferencias metodológicas entre los protocolos utilizados en el capítulo V para medir de manera directa la activación de PKA y el utilizado en este capítulo para la separar y cuantificar las holoenzimas I y II de PKA.

Consideremos en primer lugar las diferencias entre isoformas de PKA:

En tejido nervioso de *Chasmagnathus* y específicamente en el ganglio supraesofágico se han encontrado al menos dos isoformas de PKA correspondientes a los tipos I y II ya descritos en otros modelos. Dichas isoformas poseen sensibilidades al AMPc y distribuciones subcelulares distintas. RII, la subunidad regulatoria de PKAII, muestra en el cangrejo, al igual que en *Drosophila* (Foster et al., 1984) y en mamíferos (Erlichman et al., 1974) la capacidad de autofosforilación. En detalle estudiada en mamíferos, la autofosforilación implica la fosforilación de una serina de la subunidad regulatoria (R II) en el sitio de interacción con la subunidad catalítica. La fosforilación es catalizada por la propia subunidad catalítica. Dicha modificación, no cambia la afinidad de la enzima por el AMPc, pero reduce la afinidad entre subunidades regulatorias y catalíticas, de modo tal que una vez activa retarda la reasociación de la holoenzima (Rangel-Aldao & Rosen; 1976; 1977). Además de esta modificación, se ha observado en sistema nervioso de *Drosophila*, que la reasociación de PKA II una vez activa es regulada negativamente por una proteólisis parcial que reduce la afinidad entre las subunidades (Müller & Spatz, 1989). Esta regulación se da por acción de una proteasa específica dependiente de  $Ca^{2+}$ , calpaina.

Los mecanismos de autofosforilación y proteólisis parcial confieren a RII estabilidad en su estado disociado, por lo que a sido propuestos en otros modelos como mecanismos responsables de prolongar la activación de PKA durante el proceso de consolidación (Buxbaum & Dudai, 1989; Aszodi et al., 1991).

Un mecanismo que permite prolongar la activación de PKA I, una vez que se restablecen los niveles de AMPc, ha sido caracterizado para la activación persistente de PKA que subyace la facilitación sináptica en *Aplysia*. Este mecanismo de regulación es dependiente de la síntesis proteica (Bergold et

al., 1990). La subunidad análoga a RI en *Aplysia*, N4, es proteolizada por el sistema ubiquitina-proteosoma (Chain et al., 1995), lo cual es dependiente de la expresión del gen temprano de la hidroxilasa del C-terminal de ubiquitina (Ap-uch) inducido por la propia activación de PKA. AP-uch alcanza su máxima expresión 3,5 horas después de iniciado el tratamiento que induce la facilitación (Hegde et al., 1997). Se ha observado también que para que ocurra la degradación de N4, es necesario que la expresión de Ap-uch coexista con niveles elevados de AMPc, ya que la unión al nucleótido convierte a la subunidad regulatoria en sustrato para la unión a ubiquitina (Chain et al., 1999). Estos resultados sugieren que la activación de PKA I durante los primeros instantes y hasta el menos dos horas desde el comienzo de la estimulación se debe básicamente al mantenimiento de niveles altos de AMPc lo que constituye un estado de activación reversible si el AMPc volviera a valores basales.

Se ha probado también que la inducción del sistema ubiquitina-proteosoma posee un papel fundamental en el proceso de consolidación de un paradigma de evitación pasiva en ratas. En este modelo la actividad proteolítica del proteosoma aumenta cuatro horas después del entrenamiento (Lopez-Salon et al., 2001). Si bien en este último caso no se ha encontrado relación entre la actividad de proteosoma y la degradación de la subunidad regulatoria de PKA, interesa resaltar que el tiempo de retardo para la acción del sistema de degradación es similar al de *Aplysia*.

Considerando estos antecedentes, y los resultados en el presente capítulo, descartamos en principio que la activación de PKA medida inmediatamente después del entrenamiento se deba a la degradación de R I.

Consideremos ahora las diferencias metodológicas utilizadas para medir activación de PKA y para separar las holoenzimas en las columnas:

En el capítulo V, durante la medición directa de la activación de PKA inducida por la experiencia, se trabajó con un protocolo de extracción y reacción al que podríamos denominar de tipo "**conservativo**". Este protocolo, fue adoptado con el objetivo de preservar *in vitro* el estado de activación endógeno inducido

por el tratamiento. Se redujeron al máximo posible los tiempos de preparación de extractos y de reacción (aprox. 3 minutos) y se ajustaron condiciones que no favorecieran la reasociación de las subunidades disociadas (ver capítulo V). En el presente capítulo, para separar las isoformas de PKA presentes en los extractos, fue imposible reducir los tiempos necesarios para preparación y centrifugado de extractos y cargado de la columna que inevitablemente requieren un total aproximado de 20-30 minutos y además resulta imposible trabajar con NaCl en el extracto ya que la isoforma I de PKA no sería retenida en la columna de intercambio aniónico a esa fuerza iónica. Podríamos denominar a este segundo protocolo como **no conservativo** y asumir que en estas condiciones los estados reversibles de activación endógena de PKA puedan ver alterados.

Los resultados de este capítulo en base al comportamiento diferencial de ambas activaciones en las columnas de intercambio aniónico, indican la existencia de mecanismos diferentes responsables de la activación de PKA observada luego de la exposición al contexto y del entrenamiento. La activación de PKA luego de la exposición al contexto es producto de la activación de PKA II, que a su vez evidencia ser persistente ante el cambio de protocolo. La activación de PKA luego del entrenamiento muestra un comportamiento contradictorio, dado que no se evidencia en los resultados de este capítulo como la disociación de una o dos de las holoenzimas. Teniendo en cuenta las diferencias ya mencionadas que pueden introducir los protocolos de tipo “**conservativo**” y “**no conservativo**” respecto de activaciones reversibles y persistentes, consideramos que la activación inducida por el entrenamiento es de tipo reversible y dependiente de concentraciones elevadas de AMPc. Basándonos en los antecedentes de *Aplysia*, en los cuales la activación de PKA I no es estabilizada por degradación de la subunidad regulatoria sino hasta dos horas después de iniciado el protocolo de inducción, y que la activación de PKA II en los animales contexto revela ser persistente, consideramos que la activación de PKA inducida por el entrenamiento puede deberse a la activación mayoritaria de la isoforma I de PKA. Esta interpretación no descarta que en los animales expuesto al contexto también exista un

componente de PKA I en la activación inducida y que como en los animales entrenados es pausable a reasociación.

#### **7.4.1.2 Activación de la subunidad catalítica de PKA independiente de cAMP**

El hecho de que el perfil de elución de las isoformas de PKA sea el mismo en animales naive y entrenados, es decir que no se haya observado disociación de la holoenzima en entrenados, sugiere también otra explicación alternativa a la anterior, y es que exista una activación de la subunidad catalítica de PKA independiente de AMPc y de la disociación de la holoenzima. La subunidad catalítica de PKA ha sido recientemente encontrada formando parte del complejo ternario NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B-C. (Zhong et al., 1997). La separación de I $\kappa$ B después de la inducción por agentes activadores de NF $\kappa$ B provoca la activación de esta subunidad catalítica de PKA que fosforila p65 (Rel A) de una manera independiente de AMPc. Se ha demostrado también que el péptido Angiotensina II (Ang-II) estimula la degradación de I $\kappa$ B activando la subunidad C y aumentando la fosforilación de NF $\kappa$ B sin estimular la producción de AMPc (Dulin et al., 2001).

El entrenamiento provoca en ganglio supraesofágico de *Chasmagnathus* la activación de NF $\kappa$ B (Freudenthal et al., 1998; Freudenthal & Romano, 2000) y el bloqueo de dicha activación con sulfazalasina resulta amnésico (Merlo et al., 2002). Por otro lado, se ha probado en cangrejo el efecto hipermnésico de la Angiotensina II y el papel modulador del sistema de angiotensinas endógenas en la consolidación de la memoria (Delorenzi et al., 1996; Delorenzi et al., 2000). Se ha demostrado más recientemente que la Angiotensina II induce la activación de NF $\kappa$ B en el tejido nervioso del cangrejo (Frenkel et al., 2002).

En base a estos antecedentes, bien podríamos considerar que la activación de PKA observada inmediatamente después del entrenamiento tenga su origen vinculado a la activación de NF $\kappa$ B, independiente de AMPc y sin implicar la disociación de la holoenzima de PKA. Esta interpretación explica también el hecho de no encontrar diferencia en la elución de las isoformas de PKA de las

columnas de intercambio aniónico. Sin embargo existe un aspecto que no coincide plenamente con este modelo: El Rp-8Cl-cAMPs, la droga con efecto amnésico utilizada en el transcurso del capítulo III es un análogo del AMPc que interfiere con la activación de PKA por un mecanismo competitivo con el AMPc. Por lo tanto, si bien no se puede descartar que la activación de C ligada a NF- $\kappa$ B ocurra durante el aprendizaje, podemos tener certeza de que la activación de PKA por un mecanismo dependiente de AMPc es fundamental para la consolidación.

#### **7.4.1.3 Especificidad mecanística**

Las interpretaciones anteriores a cerca de los posibles mecanismos e isoformas involucradas en la activación de PKA en los animales entrenados no son mutuamente excluyentes. Sí resulta importante resaltar que no son iguales a los mecanismos implicados en la activación inducida por la exposición al contexto en cuyo caso interviene la disociación de la holoenzima de tipo II de PKA.

Estos resultados sugieren que la naturaleza del aprendizaje o experiencia vivida por el animal determinan de manera específica el comportamiento de la vía transducción del AMPc. Este comportamiento diferencial debe ser considerado como elemento central en la especificidad de la inducción de procesos que desencadenan cambios comportamentales y formación de memorias acordes a la experiencia que las indujo.

La participación diferencial de distintas isoformas de una misma proteína dependiendo del tipo de aprendizajes ya ha sido incluso demostrado a otro nivel de esta mismas vía de transducción. Como ya se ha discutido en la introducción de esta tesis, la adenilato ciclasa (AC) es la proteína que transduce señales extracelulares en aumento de AMPc intracelular. Existen hasta ahora al menos 9 isoformas de AC caracterizadas en mamíferos y cada una con propiedades y características únicas de activación. Es conocido ya en diversos modelos y paradigmas el papel fundamental de esta enzima en proceso de aprendizaje y memoria. Recientemente se ha demostrado en

ratones la participación diferencial de distintas isoformas en tareas de aprendizaje. Una tarea de tipo espacial y una de tipo no espacial activan diferencialmente distintas isoformas de Adenilato ciclasa (Guillou et al., 1999).

Proponemos que es necesario demostrar la activación específica en tiempo y espacio de las distintas isoformas de PKA para obtener un completo entendimiento del papel que la activación de PKA juega en el proceso de formación de la memoria.

#### **7.4.2 El aumento de los niveles de PKA I es responsable del aumento en actividad de PKA durante el segundo período de dependencia para la consolidación**

Se ha demostrado en este capítulo que seis horas después del entrenamiento existe un incremento neto en la cantidad de la isoformas I de PKA. Esta mayor cantidad de PKA I explica el aumento de la actividad basal y total de PKA determinado como consecuencia del entrenamiento en el capítulo V. En el capítulo III se ha demostrado que este aumento es un evento funcional del proceso de consolidación ya que la inhibición de PKA durante este periodo muestra efecto amnésico.

Los cambios en la proporción de las distintas isoformas de subunidades de PKA han sido propuesto como un mecanismo capaz de proveer a las células de diversidad y plasticidad en la acción del AMPc (Cadd et al., 1990). En el caso observado en cangrejo, aumenta la cantidad de PKA I, que es aproximadamente diez veces más sensible al AMPc que la isoforma de tipo II. Este mecanismo puede aumentar la sensibilidad de la célula a valores de estimulación que de otro modo resultarían subumbrales y proveer a la célula de valores más altos de actividad basal de PKA.

La dependencia del aumento de la actividad de PKA en fases tardías de la consolidación ha sido encontrada en varios modelos para el estudio de la memoria. Sin embargo, el mecanismo responsable de este aumento en el cangrejo resulta alternativo a los ya encontrados en otros modelos. Un

mecanismo semejante había sido inicialmente planteado para la consolidación de la facilitación de largo termino en *Aplysia*. Teniendo en cuenta la relación entre la actividad de PKA y la facilitación presináptica en *Aplysia* y conociendo la dependencia de la síntesis proteica para la expresión de la memoria de largo término, Kandel y Schwartz plantearon inicialmente la hipótesis de reemplazo de las subunidades regulatorias existentes de PKA por subunidades más sensibles al AMPc. Esta hipótesis decía que la expresión de subunidades regulatorias sensibles a valores subumbrales de AMPc y que dirigiesen específicamente a la subunidad catalítica junto a substratos específicos en la sinapsis podría constituir el cambio responsable de facilitación de largo término (Kandel & Schwartz., 1982). Sin embargo, luego los estudios se centraron en un mecanismo distinto al propuesto inicialmente para la activación persistente de PKA que subyace la facilitación durante las primeras doce horas desde la inducción. La activación inicial de PKA activa la transcripción dependiente de CREB y entre los genes inducidos se encuentra la hidroxilasa del carboxi-terminal de ubiquitina (Ap-uch). Esta hidroxilasa es el paso limitante de la proteólisis mediada por ubiquitina que conduce al clivado de la subunidad regulatoria y la consecuente disminución en la relación de subunidades regulatorias sobre las catalíticas, brindando así una mayor proporción de subunidades catalíticas libres y aumentando la actividad basal de PKA a través de un mecanismo independiente de AMPc (Greenberg et al., 1987; Bergold et al., 1990; Chain et al., 1995; Hegde et al., 1997).

El aumento persistente de la actividad de PKA también se ha encontrado en el lóbulo antenal de abejas luego de protocolos de entrenamiento que inducen la formación de una memoria olfatoria de largo término. Si bien no se conocen los mecanismos directamente implicados en el mantenimiento de la activación, se ha demostrado que la actividad persistente de PKA es dependiente de la activación del sistema de guanilato ciclasa dependiente de óxido nítrico (NO/cGMP) (Müller, 2000).

En la consolidación de un aprendizaje de evitación pasiva en ratas, se ha demostrado la existencia de una ventana de dependencia de PKA cuatro horas después del entrenamiento. Se ha determinado que, mediada por activación

de receptores dopaminérgicos D1/D5, existe una activación completa de la vía de transducción de AMPc en hipocampo, desde aumento del AMPc, activación de PKA y fosforilación de CREB (Bernabeu et al., 1997). A diferencia de los mecanismos anteriores, donde el aumento de la actividad de PKA resultaría independiente del aumento en el AMPc, en mamíferos la segunda fase de actividad de PKA sí sería dependiente de AMPc y producto de un mecanismo regulatorio en una fase tardía de la consolidación mediada por receptores dopaminérgicos.

El mecanismo encontrado en cangrejo de aumento en la isoforma más sensible de PKA, constituye una vía novedosa, alternativa a las ya conocidas, capaz de promover un aumento persistente en actividad de PKA asociado a la fase tardía del proceso de consolidación. Este mecanismo no excluye la existencia en *Chasmagnathus* de los mecanismos descritos en otros modelos.

#### **7.4.2.1 Regulación de las subunidades de PKA**

Si bien no constituyó el objetivo de este capítulo indagar sobre los mecanismos que regulan la expresión génica de las subunidades de PKA, la variación observada en el nivel de la isoforma I en animales entrenados nos lleva a interrogarnos en que grado sería factible un cambio de esta naturaleza y cuales serían los posibles niveles de regulación responsables de este cambio.

Como ya se ha expuesto en el capítulo VI, diversas isoforma de subunidades catalíticas y regulatorias han sido identificadas y caracterizadas, mayoritariamente en mamíferos. Cada una de estas esta codificada por genes distintos y con patrones propios de expresión para distintos tejidos y estadios de desarrollo. La cantidad y proporción de las isoformas de PKA no solo es una característica particular de cada tipo celular o tejido, como ya se ha demostrado también en cangrejo, sino que además es una característica dinámica que muestra variaciones en el desarrollo (Foster et al., 1984; Skálhegg et al., 2000) y en respuesta a distintos tratamientos o estímulos. Este

hecho sugiere una regulación activa y específica de cada subunidad e isoforma de PKA.

Las evidencias sugieren un papel importante de las adaptaciones de la vía de transducción del AMPc en los procesos de formación de memoria. Estas adaptaciones incluyen alteraciones de los niveles normales de subunidades catalíticas y regulatorias de PKA y sus respectivas isoformas. El modelo de facilitación sináptica en *Aplysia*, constituye un ejemplo en el cual estas adaptaciones están directamente vinculadas con la modificación de la relación estequiométrica entre subunidades catalíticas y regulatorias (cociente: R / C ) (Chain et al., 1995). En la presente tesis se muestra que durante la consolidación de una memoria de largo término en *Chasmagnathus* existe una alteración de la vía de AMPc a nivel de la cantidad y proporción entre las distintas isoformas de PKA (cociente: R I / R II ).

Lamentablemente a pesar del basto conocimiento del papel de PKA en diversos aspectos funcionales del sistema nervioso, muy poco se sabe del control de la expresión de las subunidades de PKA en neuronas (Boundy et al., 1998). La investigación de este aspecto en otros tejidos, como ser tejido gonadal de mamíferos o líneas tumorales, mayoritariamente utilizados para el estudio de la regulación de esta vía de transducción, ha probado que la expresión de las subunidades de PKA y sus isoformas pueden ser activa y específicamente reguladas a nivel de transcripción génica, de la estabilización del ARNm y de degradación de las proteínas. Se ha demostrado regulación diferencial de la expresión de isoformas por hormonas que actúan a través de receptores ligados a proteínas G (Jahnsen et al., 1985; Øyen et al., 1988), de receptores de señales mitogénicas asociados a proteínas tyrosina quinasas (Skålhegg et al., 2000), y por hormonas esteroideas (Levy et al., 1989). Se ha hallado que la actividad eléctrica normalmente impuesta por motoneuronas regula en fibras musculares la expresión de isoformas específicas a nivel transcripcional y post-transcripcional (Hoover et al., 2002). Se ha comprobado también que las propias señales de AMPc intervienen como mecanismos de autorregulación ya sea sensibilizando o desensibilizando el sistema, a nivel de la transcripción génica (Tasken et al., 1991; Tasken et al., 1993; Knutsen et al.,

1997) de la estabilización de ARNm (Knutsen et al., 1991) y de la estabilidad de la proteína (Houge et al., 1990). Los mecanismos post-traduccionales de regulación, que incluyen la degradación de subunidades C y R libres, han sido descritos más que nada como mecanismos autorregulatorios tendientes a mantener una estequiometría compensada de las subunidades catalíticas y regulatorias con el fin de preservar la homeostasis celular (Amieux et al., 1997, Boundy et al., 1998). Sin embargo, el control de la estequiometría R-C por degradación, puede traer consigo cambios en la relación PKAI -PKAII, sin que haya cambios al nivel de la transcripción o síntesis de las isoformas de R. Se ha comprobado que la reducción de los niveles de RI es compensada por aumento en RII estabilizada como PKAII (Nesterova et al., 2000) y viceversa, que la reducción de RII es compensada por aumento de RI (Amieux et al., 1998). El mismo mecanismo lleva a que la sobre expresión de una isoforma traiga aparejada la reducción de otras (Otten et al., 1989). Sin embargo, el cambio en la proporción de isoformas, no siempre es el resultado de un fenómeno pasivo por estabilización de las subunidades en la holoenzima, sino también como una respuesta activa de aumento en la síntesis diferencial de alguna isoforma (Tasken et al., 1991; Knutsen et al., 1997; Hoover et al., 2002; Dwivedi et al., 2002). Para diversas isoformas se ha secuenciado en ratones, en cerdos y en humanos las secuencias regulatorias de los genes de algunas subunidades de PKA y se ha encontrado conservada una secuencia consenso de tipo CRE en la región promotora de la subunidad R I $\alpha$  (Nowak et al., 1987; Solberg et al., 1997). Esto podría explicar en esos mismos modelos la regulación positiva rápida de la transcripción de esta subunidad ante el aumento de AMPc, similar a la conocida inducción de c-fos por AMPc y diferente a la de otras subunidades de PKA que muestran inducción más lenta probablemente mediadas a su vez por factores de transcripción inducibles por AMPc.

Como se demuestra de los antecedentes mencionados, la expresión de distintas subunidades específicas de PKA y sus isoformas pueden estar reguladas a diversos niveles, transcripción, traducción y de estabilidad de la proteína y por efecto de diversos estímulos, incluido el mismo aumento de

AMPC y la fosforilación mediada por PKA. De los resultados obtenidos en esta tesis no resulta posible determinar el origen del incremento observado en la isoforma I de PKA seis horas después del entrenamiento. Bien podría deberse a una regulación negativa en la degradación de esta o de una regulación positiva de la síntesis. Dado que la conformación de la holoenzima protege a las subunidades de la actividad proteolítica, un aumento en la síntesis de la subunidad catalítica podría contribuir a la estabilización de RI o viceversa y en ambos casos el resultado sería un aumento de PKA I como el observado. Solo los animales entrenados muestran este aumento seis horas después de la experiencia, y como ya se ha discutido, la activación temprana de PKA dada en animales entrenados y expuestos al contexto tienen origen en distintos mecanismos, posiblemente la inducción de PKA I sea un fenómeno diferencialmente inducido por esos distintos mecanismos.

Se debe resaltar que cualquiera sea el origen del aumento, por inducción dirigida de la síntesis o por un fenómeno compensatorio o colateral de la activación temprana de PKA, constituye un evento funcional en el proceso de consolidación de la memoria en *Chasmagnathus*.

#### **7.4.3 El cambio en la proporción de las isoformas es transitorio, restituyéndose los valores normales 24 horas después del entrenamiento.**

A diferencia de los requerimientos moleculares bioquímicos observados en ratas para la evocación de un aprendizaje de evitación pasiva (Szapiro et al., 2000), se ha demostrado que la activación de PKA no es necesaria durante la evocación de la memoria de largo término en *Chasmagnathus* y tampoco lo es para la facilitación sináptica en *Aplysia* cuando es evaluada 24 hs después de la inducción (Hegde et al., 1997; Chain et al., 1999). Sin embargo, en este último caso no hay coincidencia entre la independencia de PKA y la correlación bioquímica, ya que se ha encontrado que la actividad de PKA permanece elevada durante ese período (Sweatt & Kandel., 1989; Müller & Carew, 1998) por efecto de una regulación activa de la estequiometría entre

subunidades R y C (Greenberg et al., 1987; Bergold et al., 1990; Chain et al., 1995; Hegde et al., 1997). Surge entonces la pregunta de cual es el papel de ese aumento y si es parte de un mecanismo implicado en memoria. Una posible respuesta es que la actividad de PKA no es necesaria para la expresión de la memoria pero que interviene en el mantenimiento de la misma.

En cangrejo se ha encontrado que la actividad de PKA en el ganglio supraesofágico es normal 24 horas después del entrenamiento. Sin embargo debido al cambio observado en la proporción de PKA I seis horas después del entrenamiento y considerando los antecedentes de *Aplysia*, donde hay una regulación de los niveles de subunidades a largo término, en este capítulo analizamos la posibilidad de que un mecanismo de cambio en la proporción de las isoformas existiera en un periodo tardío de la memoria en *Chasmagnathus*, hecho que se descarta por los resultados de la figura 7.5.

Podemos concluir que al menos con esta estrategia experimental no fueron hallados cambios de largo término en la proporción de isoformas en el ganglio supraesofágico, sugiriendo que este mecanismo es solo necesario durante un periodo limitado. Sin embargo, no podemos descartar que al estar utilizando el ganglio entero y en forma conjunta no existan cambios localizados y de sentido contrario que se compensan en el análisis conjunto.

## **Capítulo VIII**

# **Conclusiones y discusión general**



Quisiera recuperar brevemente algunos de los conceptos explicados en la introducción general y que resultan relevantes a la interpretación de los resultados en esta tesis.

El más amplio de ellos se refiere a la participación de las vías de transducción de señales, como los mecanismos intracelulares responsables de la regulación de los procesos de plasticidad neuronal que subyacen el aprendizaje y la memoria. Las vías de transducción participan en la detección de patrones específicos de estimulación y en la ejecución de los cambios plásticos correspondientes. Las quinasas, como proteínas efectoras de las vías de transducción, participan al menos a dos niveles del proceso de plasticidad. El primer nivel lo constituye la regulación directa de la excitabilidad sináptica a través de la fosforilación de receptores y canales iónicos. El segundo, lo constituye la coordinación de la expresión génica a través de la activación de factores de transcripción. Este segundo nivel de acción resulta fundamental en la estabilización de cambios sinápticos inmunes al recambio proteico, que de otro modo borraría las modificaciones post-traduccionales adquiridas por la experiencia.

La capacidad del sistema nervioso de traducir la información contenida en una experiencia a los cambios plásticos específicos de los circuitos involucrados, reside en la acción coordinada, paralela y/o secuencial, de varias quinasas con un patrón de activación espacio-temporal que específicamente vincula la experiencia con los cambios respectivos. Dicho patrón de activación, sumado al gran número de substratos de cada quinasa, permite una sintonía muy fina de los mecanismos de procesamiento y codificación de la información (Dudai, 1997; Micheau & Riedel, 1999)

Este razonamiento parecería agregar un grado mayor de complejidad al estudio de las bases neurobiológicas del aprendizaje y la memoria, ya que imposibilita la generalización de conclusiones acerca de la participación de un determinado mecanismo celular en un proceso de plasticidad. Dicha participación será específica del modelo, del paradigma e incluso del individuo, si consideramos que cada uno puede poseer experiencias previas distintas que delinean diferencialmente el procesamiento de una información.

Sin embargo, los resultados de esta tesis constituyen una evidencia que se suma a la de otros modelos para confirmar la participación conservada de ciertos elementos celulares en los procesos de plasticidad neuronal. Evidentemente, los elementos básicos de la biología molecular y celular surgidos temprano en la evolución y han servido luego para construir procesos complejos y comunes a todos los animales como ser programas de desarrollo y de plasticidad neuronal. Así lo demuestra el estudio de los elementos que subyacen la plasticidad del comportamiento en artrópodos y cordados cuyas ramas divergieron hace 900 millones de años. El reino animal, hoy muestra una sorprendente variedad y riqueza de comportamientos que encuentran sus bases a nivel de las redes neuronales propias de cada especie y producto de la adaptación a un nicho específico. Sin embargo, adecuar el comportamiento en base a la experiencia ha sido una demanda común y conservada en todos los animales y todos los nichos. Las soluciones a esta necesidad recaen en las neuronas donde los mecanismos moleculares responsables de la plasticidad han sido conservados en la filogenia o bien reinventados a partir de los mismos elementos celulares (Carew, 2000; Tully, 1997; Menzel, 1999)

Sin embargo, además de los aspectos conservados, los resultados de esta tesis confirman también que el grado y tipo de participación de estos elementos en la consolidación, deben ser estudiados en muy estrecha relación con la experiencia que lo induce.

El objeto de estudio ha sido la participación de la vía de transducción de AMPc y más específicamente de PKA, en la formación de una memoria de largo término. Distintos aspectos de la activación de PKA fueron estudiados en su vinculación con el proceso de formación de memoria:

- a) Se comprobó para la memoria contexto-señal de *Chasmagnathus* que la acción de PKA es un mecanismo involucrado en el proceso de consolidación y no en la adquisición ni la evocación. Se ha determinado que durante el proceso de consolidación se suceden al menos dos períodos críticos en los cuales la activación de PKA es fundamental.
- b) Se determinó que la participación de PKA en el proceso de formación de la memoria no es el resultado de una modulación ajena que afecta la

- formación de la memoria, sino parte intrínseca de los mecanismos de la consolidación directamente iniciados por la experiencia.
- c) Dos experiencias distintas como son el entrenamiento contexto-señal y la exposición a un contexto nuevo, inducen activaciones de PKA con patrones temporales propios.
  - d) Se identificó la presencia de la isoforma I y II de PKA en sistema nervioso de *Chasmagnathus* con características conservadas en insectos y mamíferos
  - e) Se determinó que son distintos los mecanismos que subyacen la activación de PKA observada luego de las dos experiencias. En base a estas diferencias, la participación diferencial de las isoformas I y II es sugerida.
  - f) En base a los resultados obtenidos se ha propuesto un mecanismo responsable de la activación de PKA horas después del entrenamiento. Este mecanismo alternativo a los propuestos en otros modelos, considera un aumento en la expresión de la isoforma más sensible de PKA durante la consolidación.

### **8.1 Dos períodos de activación de PKA en la consolidación de la memoria.**

El abordaje farmacológico mediante el inhibidor de PKA, permitió precisar la existencia de al menos dos períodos del proceso de consolidación durante los cuales la acción de PKA es fundamental para la formación de la memoria contexto-señal en *Chasmagnathus*. Un resumen de estos resultados, en detalle explicados en el capítulo III, se muestra en la figura 8.1.

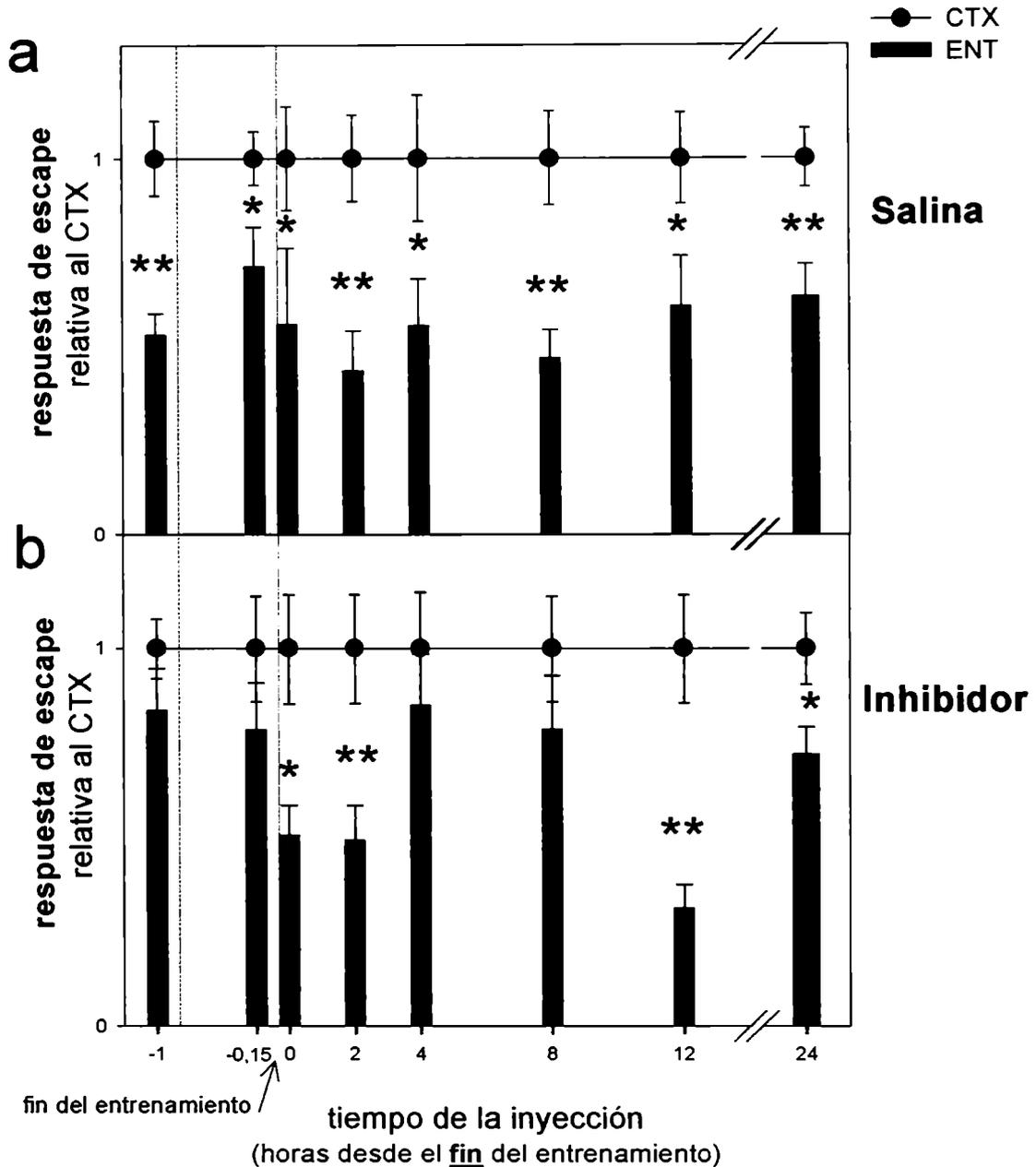
El primer período en el cual la inhibición de PKA muestra efecto amnésico está restringido al tiempo del entrenamiento. La inhibición de PKA resulta amnésica cuando el inhibidor se administra antes del entrenamiento y no después del mismo (Capítulo III). Estos resultados podrían llevar inicialmente a la interpretación de que la acción de PKA durante el primer período crítico está vinculada con la percepción de los estímulos o la adquisición del aprendizaje,

y que por ese motivo el efecto disruptor se observa cuando PKA es inhibida durante el entrenamiento (inyección pre-entrenamiento). Sin embargo, el efecto sobre la adquisición puede ser descartado porque las consecuencias de la inhibición de PKA solo se evidencian en la evaluación de la memoria de largo término y no durante el entrenamiento en el que se observó una buena memoria de corto término. La interpretación más probable, sugiere que durante el entrenamiento y como producto de los ensayos, PKA es activada y debe fosforilar una cantidad crítica de factores necesaria para el proceso de consolidación. La cantidad acumulada del producto fosforilado por PKA sería directamente dependiente del número de ensayos. Cuando PKA es inhibida después de un entrenamiento de 15 ensayos, no hay efecto amnésico, porque en ese momento del entrenamiento ya se ha alcanzado un nivel umbral de factores fosforilados necesarios para la consolidación. Este modelo, explica el hecho de que un entrenamiento de pocos ensayos resulta insuficiente para inducir la formación de la memoria de largo término a menos que PKA sea activada por una intervención farmacológica (Romano et al., 1996 b). De acuerdo con este modelo, se ha observado que el activador de PKA posee efecto facilitador inyectado antes o después del entrenamiento.

Un modelo en el cual la acumulación de un factor regula un proceso de formación de memoria de largo término ya ha sido propuesto en el paradigma de condicionamiento olfatorio en *Drosophila* (Yin et al., 1995; Tully, 1997). En dicho modelo, sucesivos ensayos de un entrenamiento conducen a la acumulación del factor de transcripción CREB activado que regula positivamente la expresión génica y la consolidación de la memoria de largo término. Se ha comprobado también que la regulación positiva del factor CREB mediante manipulación experimental reduce el número de ensayos necesarios para inducir la formación de la memoria, hecho similar al observado en el caso de la modulación positiva de PKA en *Chasmagnathus* (Romano et al., 1996 b).

Sin duda resultaría interesante y mas concluyente, evaluar este modelo a nivel de los substratos de PKA y establecer si existen umbrales de activación necesarios para inducir la consolidación y en que ensayo estos umbrales son alcanzados. Esto no ha sido posible dada la escasa información acerca de

substratos y factores de transcripción regulados por PKA en el cangrejo (este aspecto se discutirá mas adelante).



**Figura 8.1. Dos períodos sensibles a la inhibición de PKA durante la consolidación de MCS.** Los gráficos muestran respuesta de escape en la sesión de evaluación de la memoria 24 hs después del entrenamiento (media ± ES) después de la inyección de solución salina (a) o inhibidor de PKA (b) en distintos tiempos respecto del entrenamiento. La barra gris vertical indica el período de entrenamiento. CTX: animales no entrenados que permanecieron en el contexto durante la sesión de entrenamiento; ENT: animales entrenados con 15 ensayos espaciados. Los datos se muestran normalizados a la respuesta de los animales CTX.. \* $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  comparaciones planeadas CTX vs ENT.

La activación de un factor de transcripción, para el que no se descarta una vinculación con PKA (Shirakawa et al., 1989; Shirakawa & Mizel, 1989; Zhong et al., 1998), ha sido estudiada detalladamente y ha mostrado un perfil de activación que se ajusta a este modelo. El factor de transcripción NF-kB, cuya activación ha sido probada como paso fundamental para la consolidación en cangrejo (Merlo et al., 2002), alcanza el máximo de activación a partir de un número umbral de ensayos entre 10 y 15 (Freudenthal & Romano., 2000). La inhibición de la IKK, la quinasa que permite la activación y traslocación de este factor al núcleo, posee efecto amnésico durante el entrenamiento pero no inmediatamente después del mismo (Merlo et al., 2002).

La existencia de dos períodos de dependencia de PKA para la consolidación de la MCS en *Chasmagnathus*, coincide, aunque con leves diferencias temporales, con hallazgos realizados para la consolidación de la memoria de una evitación pasiva en ratas y de un condicionamiento aversivo en ratones (Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998). En ambos modelos se ha observado que los períodos de dependencia de PKA para la consolidación están sincronizados con requerimiento de síntesis de ARN m (Igaz et al., 2002) y de proteínas. En ratas se ha determinado además que coincidente con la activación de PKA y la síntesis de mensajeros, existe entre 3 y 6 horas después del entrenamiento un aumento en la activación del factor de transcripción CREB. Estos resultados sugieren que durante el proceso de consolidación se suceden al menos dos etapas de síntesis proteica reguladas por PKA.

La existencia de más de una etapa dependiente de la síntesis proteica en el proceso de consolidación ha sido demostrada también en otros modelos y paradigmas (Grecksch & Matthies, 1980; Freeman et al., 1995; Tiunova et al., 1998). Por otro lado, estudios moleculares y celulares llevados a cabo en el modelo de facilitación sináptica de *Aplysia* y en la potenciación de largo término en hipocampo de mamíferos evidencian múltiples fases de inducción génica durante la consolidación (Barzilai et al., 1989; Abraham et al., 1993). Estas observaciones sugieren que más de una fase de síntesis proteica es requerida para la instalación de la memoria de largo término. La aceptación

general es que la fase temprana de dependencia de la síntesis proteica para la consolidación consiste en la expresión de factores de transcripción y genes reguladores, mientras la fase tardía consiste en la expresión de genes efectores involucrados en los cambios sinápticos estables. De acuerdo con esta hipótesis, se ha demostrado durante la fase temprana de la facilitación sináptica en *Aplysia* la expresión de factores de transcripción y genes reguladores (Alberini et al., 1994; Hegde et al., 1997).

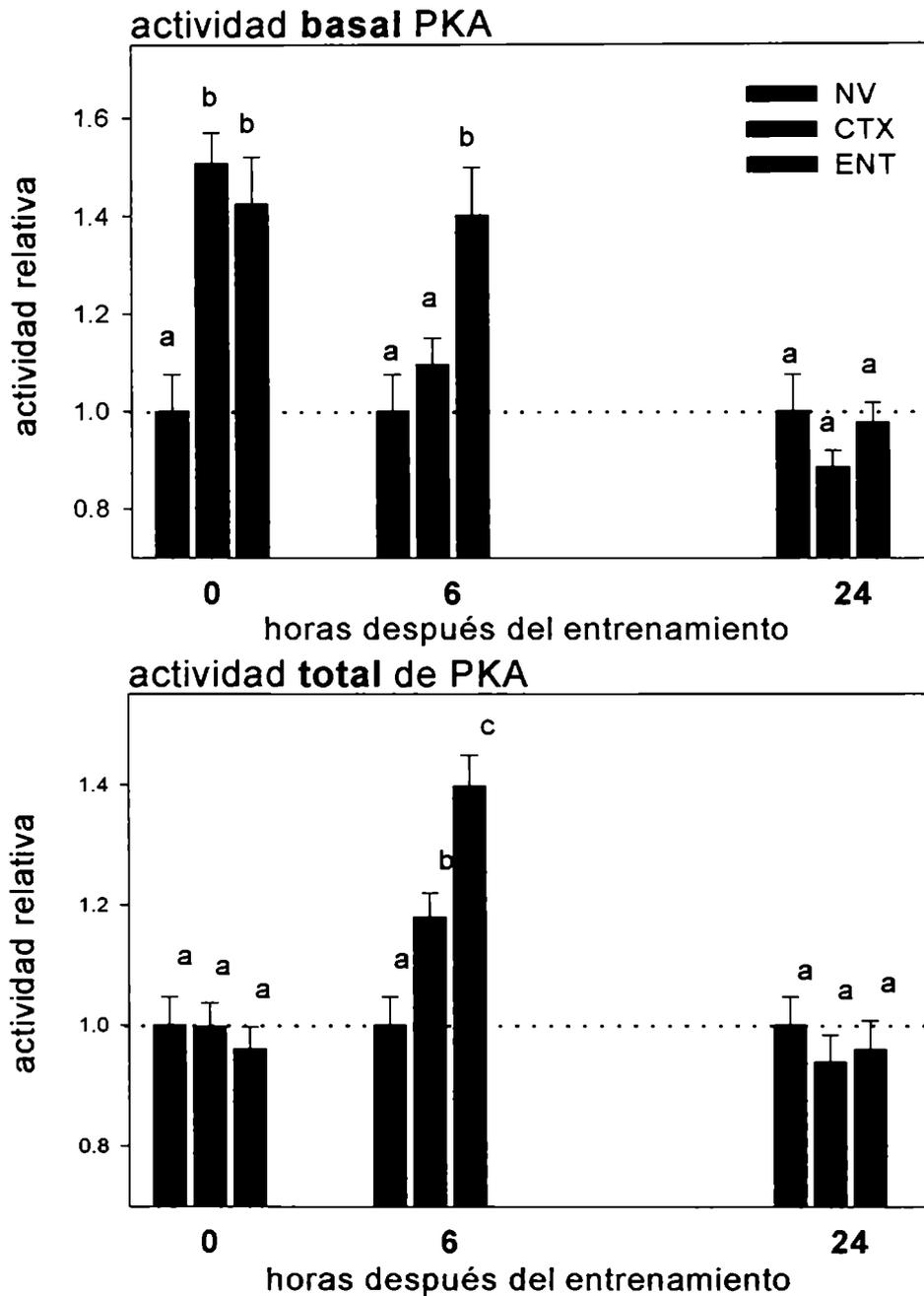
La activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B durante la consolidación de la MCS en *Chasmagnathus* sigue un perfil de activación muy similar a los requerimientos de PKA. La inhibición de la activación del factor es amnésica también durante la segunda fase, lo que sugiere que durante dicho período existe también actividad transcripcional necesaria para la consolidación. En base a estas observaciones y las de los modelos mencionados es posible que PKA esté también involucrada en la regulación de la actividad transcripcional durante el segundo período de la consolidación en *Chasmagnathus*.

Una hipótesis alternativa acerca de la actividad de PKA durante la segunda fase de activación no está relacionada con la regulación de la transcripción sino con la modificación post-transcripcional de proteínas efectoras de los cambios sinápticos y morfológicos. Respecto de esta función, se ha comprobado en hipocampo de mamíferos que la actividad de PKA directamente regula la inserción de receptores de glutamato de tipo AMPA en las sinapsis potenciadas durante la potenciación de largo término (Esteban et al., 2003). Una función de este tipo, observada horas después de la inducción del proceso de consolidación y solapada a la fase de expresión de genes efectores de los cambios sinápticos de largo término bien podría constituir un mecanismo de señalización sináptica relacionado con la incorporación específica de las proteínas sintetizadas durante la consolidación (Frey & Morris, 1997).

## **8.2 La activación de PKA es un mecanismo intrínseco de la consolidación de la memoria iniciado por la experiencia.**

Los efectos amnésicos por intervención farmacológica de la consolidación mediante el inhibidor de PKA (Capítulo III) permiten concluir que la activación de PKA observada después del entrenamiento (Capítulo V) es un elemento funcional del proceso de formación de memoria y descarta que dicha activación se trate de un efecto paralelo o inespecífico, consecuencia de la estimulación. De manera recíproca, la activación de PKA inducida por el entrenamiento, indica que el efecto amnésico de la intervención farmacológica es el resultado de operar directamente sobre los mecanismos iniciados por la experiencia y no de un efecto amnésico inespecífico, o de mediar los efectos de un modulador que ajeno a la experiencia modula las capacidades cognitivas. Esta conclusión se puede extender a los dos períodos de dependencia de PKA como lo muestran los resultados del capítulo V resumidos en la figura 8.2.

La conclusión acerca de la relación específica entre la activación de PKA y la formación de memoria de largo término, no resulta tan clara si se considera que los animales que solo han sido expuestos al contexto muestran inmediatamente después de la experiencia el mismo grado de activación que los animales entrenados, sugiriendo que la activación de PKA no esta relacionada con algo específico del entrenamiento sino con un efecto de novedad o con el estrés de la manipulación experimental. Diferentes evidencias permiten descartar esta posibilidad: En primer lugar el hecho ya mencionado de que si dicha activación es inhibida se induce amnesia. En segundo término, que la activación de PKA producto de ambas experiencias muestra patrones temporales distintos de activación (Capítulo V). Finalmente, que ambas activaciones pueden ser diferenciadas mecanísticamente en base a la participación diferencial de las isoformas I y II de PKA (Capítulo VII).



**Figura 8.2. Actividad basal y total de PKA.** Los gráficos muestran media y ES de la actividad de PKA en ganglio supraesofágico 0, 6 y 24 horas después de la experiencia para animales naive (NV), entrenados (ENT) y expuestos al contexto (CTX). La actividad de PKA fue normalizada a la actividad medida en los animales naive. La actividad basal refleja la actividad endógena y la actividad total fue estimulada con 10  $\mu$ M de AMPc. Distintas letras significan diferencias significativas  $p < 0.01$  según contrastes Duncan post ANOVA. Para más detalles ver capítulo VI.

Existen trabajos realizados con otros cangrejos que indican en este orden la capacidad de establecer memorias espaciales y mapas cognitivos (Cannicci et al., 2000). La capacidad de establecer una memoria de contexto también ha sido comprobada en *Chasmagnathus*. Animales que han estado en el actómetro sin ser estimulados, muestran 24 horas después, respuestas de escape distintas a la de animales que nunca han estado (Pedreira et al., 1996); por otro lado, los animales pueden ser condicionados a encontrar alimento en el actómetro, de modo que la sola reinserción en dicho contexto 24 horas después despliega una elevada actividad exploratoria (Hermitte & Maldonado, comunicación personal). Estas evidencias indican la capacidad de establecer memorias de contexto de largo término, lo cual se ha comprobado que es dependiente de la síntesis proteica (Pedreira et al., 1996) y aún no se ha evaluado si la formación de esa memoria es dependiente o no de la activación de PKA como lo sugiere la correlación bioquímica. Al respecto es importante destacar que si así fuera, el patrón temporal de activación de PKA para la consolidación de una y otra memoria es inducido de manera específica por las distintas experiencias.

En la consolidación de un condicionamiento aversivo en ratones, se ha observado que la participación de PKA puede variar mostrando uno o dos períodos críticos, dependiendo tan solo de que el número de ensayos del entrenamiento sea 1 o 3 (Bourtchouladze et al., 1998). En este ejemplo, la secuencia de mecanismos bioquímicos involucrados en la consolidación es distinta a pesar de que los ratones sometidos a ambos protocolos aprenden en realidad lo mismo. Teniendo en cuenta este último ejemplo, no resulta sorprendente que en cangrejo el proceso de consolidación de distintas memorias involucre activaciones de PKA con patrones temporales propios.

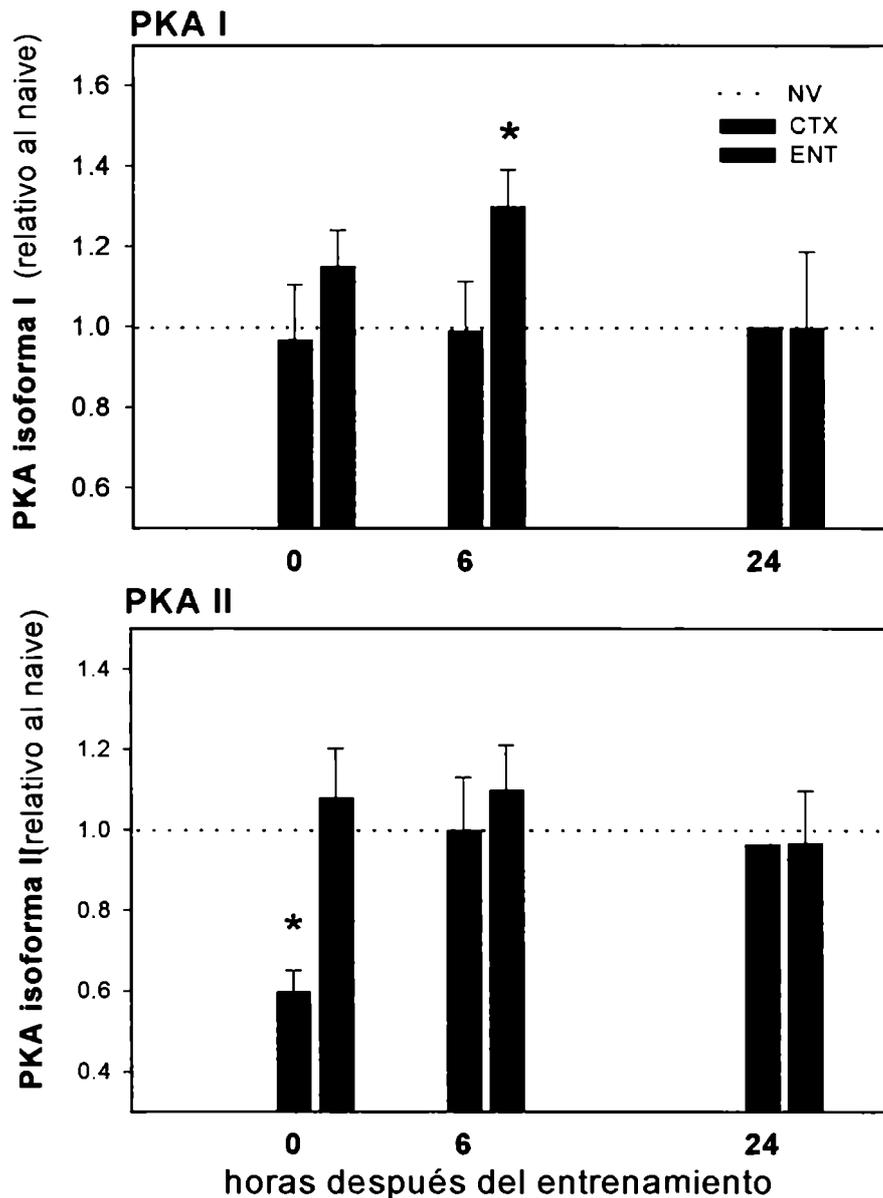
Una observación semejante en relación al proceso de consolidación, se ha hecho para la activación de MAPKs que actualmente es objeto de estudio en el laboratorio. La activación de ERK y JNK se ha medido a distintos tiempos después del entrenamiento o de la exposición al contexto, y para cada experiencia se ha determinado un patrón temporal propio de activación. Mientras en los animales expuestos al contexto la activación es máxima

inmediatamente después de la experiencia y decae una hora después, el perfil opuesto se ha encontrado para los animales que reciben el entrenamiento contexto-señal (M. Feld & A. Romano, comunicación personal).

### **8.3 Participación diferencial de isoformas de PKA en la consolidación**

Con el objeto de estudiar mecanismos que determinan la especificidad de la acción de PKA en los procesos de plasticidad, se estudió la participación de isoformas en la activación inducida por distintas experiencias y durante los dos períodos de dependencia para la consolidación de la memoria de largo término.

En base al perfil de elusión de PKA de columnas de intercambio aniónico se mostró que los mecanismos responsables de la activación de PKA inducida por cada experiencia son distintos. La activación de PKA inducida por la exposición al contexto se debe a la disociación de la isoforma de tipo II. Esta activación persiste incluso ante protocolos de extracción y reacción que no favorecen el mantenimiento del equilibrio asociado-disociado endógeno de la enzima. Contrariamente, la activación de PKA inducida por el entrenamiento solo se evidenció cuando las condiciones de extracción y reacción sí fueron diseñadas para preservar los equilibrios endógenos. Esto sugiere que la activación inducida por el entrenamiento es preservada por el mantenimiento de AMPc alto en las células. Considerando características distintivas de la activación de cada isoforma y las modificaciones que estas pueden sufrir como parte de los mecanismos de activación, ambas activaciones pueden ser interpretadas como la participación diferencial de las isoformas (ver Capítulo VII). De acuerdo a esta interpretación, la activación de PKA observada inmediatamente después del entrenamiento contexto-señal estaría vinculada con la activación de la isoforma I. En cambio, la activación de PKA inducida por la exposición al contexto involucra la participación de la isoforma II.



**Figura 8.3. Nivel de PKA I y PKA II.** Las isoformas I y II de PKA en ganglio supraesofágico fueron cuantificadas luego de su separación en columnas de intercambio aniónico 0, 6 y 24 horas después de la experiencia para animales naive (NV), entrenados (ENT) y expuestos al contexto (CTX). Los gráficos representan media y error estándar de los animales tratados relativizados a lo niveles en los animales naive.  $P < 0.05$  contrastes Tuckey post-ANOVA de Bloques.

Los únicos antecedentes que vinculan la participación de isoformas específicas con procesos de plasticidad neuronal han sido basados en el modelo de potenciación de largo término en hipocampo de mamíferos a partir

de animales carentes de la expresión de isoformas de PKA (Brandon et al., 1995; Huang et al., 1995; Woo et al., 2000 ). Estos trabajos mostraron que la capacidad para inducir y mantener estados adquiridos está directamente ligada a la presencia de isoformas específicas. Sin embargo, la limitación de estos trabajos consiste en no resolver si los resultados del experimento son consecuencia de la ausencia de una isoforma o de consecuencias del desarrollo, mas allá del hecho de que los animales carentes de esos genes no muestran deficiencias cognitivas en las pruebas comportamentales.

Si bien basados en una técnica indirecta y que no permite cuantificar de manera precisa la activación de cada isoforma, los resultados de esta tesis en el modelo de *Chasmagnathus* constituyen el primer informe que vincula la participación diferencial de isoformas de PKA con un proceso de consolidación de memoria de largo término. Los resultados también evidencian que una experiencia distinta al entrenamiento, que consiste en una exposición prolongada a un contexto nuevo y que desencadena la formación de una memoria de contexto induce un aumento en la actividad de PKA dependiente de otra isoforma. Aún queda por demostrar si esta activación posee un papel funcional en la formación de memoria del contexto.

#### **8.4 Aumento de la isoforma I de PKA en el segundo período de la consolidación**

Coincidente con el segundo período de dependencia y activación de PKA durante la consolidación, se ha determinado un aumento en la isoforma I de PKA (Figura 8.3). De acuerdo a los resultados del capítulo VI, esta isoforma es aproximadamente 10 veces más sensible al AMPc que la isoforma II (Capítulo VI). Relaciones similares de sensibilidad han sido también halladas para la isoformas I y II descritas en otros modelos. En base a esta sensibilidad, un aumento en la proporción de PKA I, puede favorecer la respuesta de PKA a valores normalmente sub-umbrales de AMPc y conllevar en la célula un nivel superior de actividad basal de PKA incluso en condiciones sin estimulación (Cadd et al., 1990). La sensibilidad de PKA I ha llevado a postular que esta

isoforma mediaría en las células los efectos dependientes de PKA en las condiciones fisiológicas y sin estimulación (Nesterova et al., 2000).

Durante la consolidación de la MCS en *Chasmagnathus*, la regulación positiva de PKA I, puede ser el mecanismo responsable de la activación de PKA observada 6 horas después del entrenamiento y que interviene durante el segundo período de dependencia para la consolidación. Este constituye un mecanismo alternativo y no excluyente de los ya propuestos en otros modelos que involucran la degradación de las subunidades regulatorias (Hegde et al., 1993; Chain et al., 1999) o el aumento de AMPc por efecto de sistemas moduladores de la consolidación (Bernabeu et al., 1997).

## **8.5 Variaciones en la proporción PKA I / PKA II**

El aumento en la isoforma I de PKA ha sido hasta aquí relacionado con la activación de PKA necesaria durante el segundo período de la consolidación. Sin embargo, este aumento y sobre todo la variación de la proporción entre las isoformas I y II debe ser analizado con cierta perspectiva, considerando las similitudes entre los procesos de plasticidad neuronal y los de desarrollo.

La proporción de las isoformas I y II varía durante el desarrollo, como se ha evidenciado para la diferenciación de distintos tipos celulares (Schwartz & Rubin, 1983; Richards & Rolfes, 1980), e incluso se ha comprobado en insectos que PKA I solo se expresa durante estadios larvales y no en animales adultos (Foster et al., 1984).

Por otro lado, variaciones en el cociente I / II de las isoformas de PKA muestran consecuencias drásticas sobre el metabolismo celular como ha sido revelado hasta ahora en modelos no directamente relacionados con la neurobiología. Se ha probado, que la variación del cociente I / II está estrechamente vinculada con procesos de crecimiento y diferenciación celular. El aumento en la expresión de PKA I correlaciona con crecimiento y transformación celular, mientras el decremento de PKA I y aumento de la proporción de PKAII correlaciona con la inhibición del crecimiento y promueve la diferenciación y maduración celular (Cho-Chung & Clair, 1993; Nesterova et

al., 2000). Manipulaciones experimentales que modulan negativamente la expresión de PKA I, revierten los procesos de transformación celular, detienen el crecimiento y promueven diferenciación de células tumorales, probando una relación causal entre el nivel de las isoformas y la respuesta metabólica (Nesterova & Cho-Chung, 1995, 2000)

Los procesos de plasticidad neuronal han sido en muchos casos analizados de manera comparada con los procesos de desarrollo por el hecho de que ambos están dirigidos por programas de expresión génica, poseen períodos lábiles sensibles a la disrupción y una vez alcanzados los estados diferenciados estos son mantenidos por programas de expresión auto-perpetuados (Alberini et al., 1994). Desde el punto de vista funcional, cada evento de plasticidad neuronal que involucre cambios estables debe ser comprendido como un pequeño proceso de desarrollo en el cual un estado de diferenciación es revertido para adoptar otro nuevo que luego será mantenido. Para esto, las neuronas existen durante todo su ciclo de vida en un estado de diferenciación semireversible que permite cambios morfológicos en respuesta a estímulos ambientales.

Los resultados de esta tesis revelan que durante el período de la consolidación existe un aumento de la isoforma I de PKA, similar al observado en el desarrollo y en células tumorales. Esta coincidencia sumada a las similitudes entre los procesos de desarrollo y los de plasticidad neuronal sugiere que el cambio observado en el cociente I / II durante la consolidación es parte del proceso de plasticidad que subyace la formación de una memoria. En adelante, resulta de interés estudiar la relación entre el cociente I / II y los procesos de plasticidad y formación de memoria en distintos paradigmas.

## **8.6 Substratos de PKA**

Las evidencias que prueban el papel fundamental de PKA en la consolidación de la MCS en cangrejo exceden ahora en mucho el conocimiento acerca de las consecuencias específicas de la acción de PKA en el metabolismo celular. En otras palabras, la participación y la regulación de la actividad de PKA durante la consolidación han sido estudiadas en detalle a nivel comportamental, y el

siguiente paso es estudiar a escala celular la secuencia de eventos que se encuentran río abajo de la activación de PKA. Con el mismo propósito sería también de sumo interés estudiar las diferencias que prosiguen a la activación de las distintas isoformas.

Las consecuencias de PKA sobre la memoria de largo término sugieren un papel fundamental de PKA en la regulación de la expresión génica responsable de los cambios de largo término. Por esto, debería ser estudiada la activación de factores de transcripción y la interacción con otras vías de transducción igualmente involucradas en la formación de memoria de largo término.

La familia de factores de transcripción de tipo CREB ha mostrado un papel central en la regulación de la expresión génica de diversos modelos para el estudio de la memoria y plasticidad sináptica. La expresión dependiente de CREB es fundamental en el proceso de facilitación de largo término en *Aplysia* (Kaang et al., 1993), condicionamiento olfatorios en *Drosophila* (Yin et al., 1994; Yin et al., 1995), ratones (Bourtchouladze et al., 1994), ratas (Guzowski & McGaugh, 1997) y en LTP de hipocampo de mamíferos (Schulz et al., 1999).

La presencia de factores de transcripción de esta familia ha sido probada en extractos neurales de *Chasmagnathus* por la técnica de corrimiento electroforético (Freudenthal, Tesis de Licenciatura, UBA). Esta técnica ha permitido probar la existencia de proteínas nucleares con capacidad de pegado a la secuencia regulatoria CRE. La identidad y activación de las proteínas que pegan CRE están siendo investigadas en este momento mediante técnicas de western-blot con anticuerpos específicos contra CREB total y CREB fosforilado.

En otros sistemas ha sido reportada una vinculación entre PKA y la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La semejanza entre los perfiles de activación de PKA y NF- $\kappa$ B durante la consolidación en *Chasmagnathus* sugiere una posible interacción entre ambas vías que esta siendo estudiada.

## 8.7 Comentarios finales

Al comienzo de esta serie de conclusiones se mencionó el aspecto conservado de los elementos celulares que participan en la formación de la memoria. La participación de PKA en procesos de formación de memorias de largo término y plasticidad neuronal ha sido probada en los más diversos modelos y paradigmas de estudio, que comprenden moluscos (Kandel & Schwartz, 1982), insectos (Davis, 1996; Fiala et al., 1999), mamíferos (Bernabeu et al., 1997; Bourchouladze et al., 1998; Abel et al., 1997) y se agrega ahora un crustáceo.

En esta tesis se dio también importancia a los aspectos específicos que envuelven la participación de PKA en relación a una experiencia dada. Los resultados indican que aspectos temporales y mecánicos de la activación de PKA son función específica de la experiencia que lo induce. Como se observó de la activación de PKA medida en los animales entrenados y los que solo estuvieron en el contexto del entrenamiento, los mecanismos celulares involucrados en un aprendizaje no son la suma de los mecanismos individuales inducidos por cada uno de los estímulos que conforma la experiencia. Esto es congruente con el hecho de pensar que cada experiencia induce los cambios correspondientes a través de patrones específicos de activación de las vías de transducción.

De acuerdo a los resultados de esta tesis, futuros estudios que apunten al papel de la vía de transducción de AMPc en la formación de memoria, deberán considerar también la participación de las isoformas de PKA en concierto con las múltiples formas de regulación con las que la vía de transducción participa en procesos de plasticidad neuronal.



Fernando Loastelli



A. Romano  
Director



# **Bibliografía**



- Abbott J. 1970**  
Absence of blood-brain barrier in a crustacean, *Carcinus maenas* L. *Nature*. 225(229):291-3
- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, 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 WC, Mason SE, Demmer J, Williams JM, Richardson CL, Tate WP, Lawlor PA, Dragunow M. 1993**  
Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation *Neuroscience*. 56(3):717-27..
- Abrams TW, Yovell Y, Onyike CU, Cohen JE, Jarrard HE. 1998**  
Analysis of sequence-dependent interactions between transient calcium and transmitter stimuli in activating adenylyl cyclase in *Aplysia*: possible contribution to CS-US sequence requirement during conditioning. *Learn Mem*. 4(6):496-509.
- Adrian ED. 1947.**  
*The physical background of perception* Oxford: Clarendon press
- Agranoff BW. 1972.**  
*The chemistry of mood motivation and memory*. New York: Plenum press
- Alberini CM, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER. 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, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza T, Pereira P, Szapiro G, Viola H, Pitossi F, Izquierdo I, Medina JH. 2002**  
BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*. 12(4):551-60.
- Alonso M, Viola H, Izquierdo I, Medina JH. 2002**  
Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*. 77(1):119-24.
- Amieux PS, Cummings DE, Motamed K, Brandon EP, Wailes LA, Le K, Idzerda RL, McKnight GS. 1997**  
Compensatory regulation of RI-alpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J Biol Chem*. 272(7):3993-8.
- Antoni FA. 2000**  
Molecular diversity of cyclic AMP signaling. *Front Neuroendocrinol*. 21(2):103-32.
- Aszodi A, Muller U, Friedrich P, Spatz HC. 1991**  
Signal convergence on protein kinase A as a molecular correlate of learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(13):5832-6.
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. 1998**  
The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci*. 1(7):602-9.
- Atkinson RC, Schiffrin RM 1968**  
A proposed system and its control processes. En (Spence KW, Spence JT ed) *The psychology of learning and motivation: advances in research and theory* New york: Accademic vol II. Pp89-195
- Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, Tsien RY. 1993**  
Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science*. 260(5105):222-6.
- Bailey CH, Chen M. 1983**  
Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science*. 220(4592):91-3.

**Bailey CH, Chen M. 1989**

Time course of structural changes at identified sensory neuron synapses during long-term sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci* 9(5):1774-80.

**Bailey CH, Kaang BK, Chen M, Martin KC, Lim CS, Casadio A, Kandel ER. 1997**

Mutation in the phosphorylation sites of MAP kinase blocks learning-related internalization of apCAM in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*. 18(6):913-24.

**Bailey CH, Kandel ER. 1993**

Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol*. 55:397-426.

**Barondes SH 1975.**

Protein synthesis-dependent and protein synthesis-independent memory storage processes. En *Short-Term Memory* (Deutsch D, Deutsch JA eds) New York: Academic press pp379-390

**Bartsch D, Casadio A, Karl KA, Serodio P, Kandel ER. 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.

**Bartsch D, Ghirardi M, Skehel P, Karl K, Herder SP, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. 1995**

*Aplysia* CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell*. 83(6):979-92.

**Barzilai A, Kennedy TE, Sweatt JD, Kandel ER. 1989**

5-HT modulates protein synthesis and the expression of specific proteins during long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*. 2(6):1577-86.

**Baustein DN, Derby CD, Simmons RB, Beall AC. 1988**

Structure of the brain and medulla terminalis of the spiny lobster *Panilargus argus* and the crayfish *Procambrus clarkii*, with an emphasis on the olfactory centers. *J Crustacean Biol* 8:493-519

**Beebe SJ, Corbin JD. 1986.**

Cyclic nucleotide dependent protein kinases. *The enzymes* 17:43-111

**Beebe SJ, Holloway R, Rannels SR, Corbin JD. 1984**

Two classes of cAMP analogs which are selective for the two different cAMP-binding sites of type II protein kinase demonstrate synergism when added together to intact adipocytes. *J Biol Chem*. 259(6):3539-47.

**Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Froyso A, Hansson V, Jahnsen T. 1990**

Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol*. 4(3):465-75.

**Bergold PJ, Beushausen SA, Sacktor TC, Cheley S, Bayley H, Schwartz JH. 1992**

A regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase down-regulated in *aplysia* sensory neurons during long-term sensitization. *Neuron*. 8(2):387-97.

**Bergold PJ, Sweatt JD, Winicov I, Weiss KR, Kandel ER, Schwartz JH. 1990**

Protein synthesis during acquisition of long-term facilitation is needed for the persistent loss of regulatory subunits of the *Aplysia* cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(10):3788-91.

**Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. 1998**

Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci*. 18(23):10037-44.

**Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH. 1996**

Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*. 7(2):585-8.

- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. 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.
- Bernabeu R, Izquierdo I, Cammarota M, Jerusalinsky D, Medina JH. 1995**  
Learning-specific, time-dependent increase in [3H]phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. *Brain Res.* 685 (1-2):163-8.
- Beron de Astrada M, Maldonado H. 1999**  
Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 63(1):109-18.
- Beron de Astrada M, Sztarker J, Tomsic D. 2001**  
Visual interneurons of the crab *Chasmagnathus* studied by intracellular recordings in vivo.  
*J Comp Physiol [A].* 187(1):37-44.
- Beron de Astrada M, Tomsic D. 2002**  
Physiology and morphology of visual movement detector neurons in a crab (Decapoda: Brachyura). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 188(7):539-51.
- Bevilaqua L, Ardenghi P, Schroder N, Bromberg E, Quevedo J, Schmitz PK, Bianchin M, Walz R, Schaeffer E, Medina JH, Izquierdo I. 1997**  
Agents that affect cAMP levels or protein kinase A activity modulate memory consolidation when injected into rat hippocampus but not amygdala. *Braz J Med Biol Res.* 30(8):967-70.
- Bornfeldt KE, Krebs EG. 1999**  
Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal.* 11(7):465-77.
- Boundy VA, Chen J, Nestler EJ. 1998**  
Regulation of cAMP-dependent protein kinase subunit expression in CATH.a and SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 286(2):1058-65.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. 1998**  
Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem.* 5(4-5):365-74.
- Bourtchouladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. 1994**  
Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell.* 79(1):59-68.
- Boxall AR, Lancaster B. 1998**  
Tyrosine kinases and synaptic transmission.  
*Eur J Neurosci.* 10(1):2-7.
- Bradford MM. 1976**  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7;72:248-54.
- Braha O, Dale N, Hochner B, Klein M, Abrams TW, Kandel ER. 1990**  
Second messengers involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(5):2040-4.
- Brandon EP, Zhuo M, Huang YY, Qi M, Gerhold KA, Burton KA, Kandel ER, McKnight GS, Idzerda RL. 1995**  
Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(19):8851-5.
- Brostrom CO, Corbin JD, King CA, Krebs EG. 1971**  
Interaction of the subunits of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase of muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(10):2444-7

**Brunelli M, Castellucci V, Kandel ER. 1976**

Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science*. 194(4270):1178-81.

**Brunner D, Maldonado H. 1988**

Habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*: effect of morphine and naloxone. *J Comp Physiol [A]*. 162(5):687-94.

**Bullock TH, Horridge GA. 1965**

Structure and function in the nervous system of invertebrates Vol II (Whitaker, Emerson, Kennedy eds) London:Freeman and Company

**Burchuladze R, Potter J, Rose SP. 1990**

Memory formation in the chick depends on membrane-bound protein kinase C. *Brain Res* 535(1):131-8

**Buxbaum JD, Dudai Y. 1989**

A quantitative model for the kinetics of cAMP-dependent protein kinase (type II) activity. Long-term activation of the kinase and its possible relevance to learning and memory. *J Biol Chem*. 264(16):9344-51.

**Byers D, Davis RL, Kiger JA Jr. 1981**

Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 289(5793):79-81.

**Byrne JH, Kandel ER. 1996**

Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci*. 16(2):425-35.

**Byrne JH, 1987**

Cellular analysis of associative learning. *Physiol Rev* 67(2):329-439

**Cadd GG, Uhler MD, McKnight GS. 1990**

Holoenzymes of cAMP-dependent protein kinase containing the neural form of type I regulatory subunit have an increased sensitivity to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*. 265(32):19502-6.

**Camarota M, Bernabeu R, Levi De Stein M, Izquierdo I, Medina JH. 1998**

Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *Eur J Neurosci*. 10(8):2669-76.

**Cannicci S, Barelli C, Vannini M. 2000**

Homing in the swimming crab *Thalamita crenata*: a mechanism based on underwater landmark memory. *Anim Behav*. 60(2):203-210.

**Carew TJ 2000.**

*Behavioral Neurobiology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, inc

**Carew TJ, Pinsker H, Kandel ER. 1972.**

Long-term habituation of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 175: 451-454

**Carew TJ, Walters ET, Kandel ER. 1981**

Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J Neurosci*. 1(12):1426-37.

**Castellucci VF, Blumenfeld H, Goelet P, Kandel ER. 1989.**

Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J Neurobiol* 20:1-9

**Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH, Wilson FD, Nairn AC, Greengard P. 1980**

Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(12):7492-6.

**Castellucci VF, Nairn A, Greengard P, Schwartz JH, Kandel ER. 1982**

Inhibitor of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase blocks presynaptic facilitation in *Aplysia*. *J Neurosci*. 2(12):1673-81.

- Cedar H, Kandel ER, Schwartz JH. 1972**  
Cyclic adenosine monophosphate in the nervous system of *Aplysia californica*. I. Increased synthesis in response to synaptic stimulation. *J Gen Physiol.* 60(5):558-69.
- Chain DG, Casadio A, Schacher S, Hegde AN, Valbrun M, Yamamoto N, Goldberg AL, Bartsch D, Kandel ER, Schwartz JH. 1999**  
Mechanisms for generating the autonomous cAMP-dependent protein kinase required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron.* 22(1):147-56.
- Chain DG, Hegde AN, Yamamoto N, Liu-Marsh B, Schwartz JH. 1995**  
Persistent activation of cAMP-dependent protein kinase by regulated proteolysis suggests a neuron-specific function of the ubiquitin system in *Aplysia*. *J Neurosci.* 15(11):7592-603.
- Chang FF, Greenough WT. 1984.**  
Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res* 309:35-46.
- Chern Y. 2000**  
Regulation of adenylyl cyclase in the central nervous system. *Cell Signal.* 12(4):195-204
- Chetkovich DM, Gray R, Johnston D, Sweatt JD. 1991**  
N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(15):6467-71.
- Chew CS. 1985**  
Parietal cell protein kinases. Selective activation of type I cAMP-dependent protein kinase by histamine. *J Biol Chem.* 260(12):7540-50.
- Cho-Chung YS, Clair T. 1993**  
The regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase as a target for chemotherapy of cancer and other cellular dysfunctional-related diseases. *Pharmacol Ther.* 60(2):265-88.
- Choi EJ, Wong ST, Dittman AH, Storm DR. 1993**  
Phorbol ester stimulation of the type I and type III adenylyl cyclases in whole cells. *Biochemistry* 2(8):1891-4
- Clegg CH, Cadd GG, McKnight GS. 1988**  
Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(11):3703-7.
- Colley PA, Sheu FS, Routtenberg A. 1989**  
Dose-dependent phorbol ester facilitation or blockade of hippocampal long-term potentiation: relation to membrane/cytosol distribution of protein kinase C activity. *Brain Res.* 495(2):205-16.
- Connolly JB, Roberts IJ, Armstrong JD, Kaiser K, Forte M, Tully T, O'Kane CJ. 1996**  
Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science.* 274(5295):2104-7.
- Cooper DM, Mons N, Karpen JW. 1995**  
Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374(6521):421-4
- Corbin JD, Soderling TR, Park CR. 1973**  
Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J Biol Chem.* 248(5):1813-21.
- Corbin JD, Keely SL, Park CR. 1975**  
The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J Biol Chem.* 250(1):218-25.
- Corfas G, Dudai Y. 1990**  
Adaptation and fatigue of a mechanosensory neuron in wild-type *Drosophila* and in memory mutants. *J Neurosci.* 10(2):491-9.

**Corkin S. 1984**

Lasting consequences of bilateral medial temporal lobectomy: Clinical course and experimental findings in H.M. *Semin Neurol* 4: 249-459

**Crow T , Forrester J. 1990**

Inhibition of protein synthesis blocks long-term enhancement of generator potential produced by one-trial *in vivo* conditioning in *Hermissenda*. *Proc Natl Acad Scie USA*. 87:4490-4494

**Crow T, Xue-Bian JJ, Siddiqi V, Kang Y, Neary JT. 1998**

Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by one-trial and multi-trial classical conditioning. *J Neurosci*. 18(9):3480-7.

**Cytrynska M, Wojda I, Frajnt M, Jakubowicz T. 1999**

PKA from *Saccharomyces cerevisiae* can be activated by cyclic AMP and cyclic GMP. *Can J Microbiol*. 45(1):31-7.

**Dale N, Kandel ER.1990**

Facilitatory and inhibitory transmitters modulate spontaneous transmitter release at cultured Aplysia sensorimotor synapses. *J Physiol*. 421:203-22

**Davies HP, Squire LR 1984.**

Protein synthesis and memory: A review. *Psychol Bull* 96:518-559.

**Davis RL. 1996**

Physiology and biochemistry of Drosophila learning mutants. *Physiol Rev*.76(2):299-317.

**de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. 1998**

Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 396(6710):474-7.

**Delorenzi A, Pedreira M, Romano A, Garcia S, Pirola CJ, Nahmod VE, Maldonado H. 1996**

Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull*. 41(4):211-20.

**Delorenzi A, Maldonado H. 1999**

Memory enhancement by the angiotensinergic system in the crab *Chasmagnathus* is mediated by endogenous angiotensin II. *Neurosci Lett*. 266(1):1-4.

**Delorenzi A, Dimant B, Frenkel L, Nahmod VE, Nassel DR, Maldonado H 2000.**

High environmental salinity induces memory enhancement and increases levels of brain angiotensin-like peptides in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *J Exp Biol*. 203 Pt 22:3369-79.

**Devay P, Pinter M, Yalcin AS, Friedrich P. 1986**

Altered autophosphorylation of adenosine 3',5'-phosphate-dependent protein kinase in the dunce memory mutant of *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*. 18(1):193-203.

**Dickinson A. 1980.**

*Contemporary animal learning theory*. Cambridge: Cambridge Univ Press

**DiFrancesco D, Tortora P. 1991**

Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351(6322):145-7.

**Drain P, Folkers E, Quinn WG. 1991**

cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron*. 6(1):71-82.

**Dubnau J, Grady L, Kitamoto T, Tully T. 2001**

Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*. 411(6836):476-80.

**Dudai Y, Buxbaum J, Corfas G, Orgad S, Segal D, Sher B, Uzzan A, Zvi S. 1986**

Defective cAMP metabolism and defective memory in *Drosophila*. *Acta Biochim Biophys Hung*. 21(3):177-92.

- Dudai Y. 1997**  
Time to remember. *Neuron*.18(2):179-82.
- Dulin NO, Niu J, Browning DD, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya T. 2001**  
Cyclic AMP-independent activation of protein kinase A by vasoactive peptides.  
*J Biol Chem*. 276(24):20827-30.
- Duncan CP. 1949**  
The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol* 42:32-44
- Dunn AJ. 1980**  
Neurochemistry of learning and memory: An evaluation of recent data.  
*Annu Rev Psychol*. 31:343-390.
- Dura JM, Taillebourg E, Preat T. 1995**  
The Drosophila learning and memory gene *linotte* encodes a putative receptor tyrosine kinase homologous to the human RYK gene product. *FEBS Lett*. 370(3):250-4.
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Pandey GN. 2002**  
Differential effects of haloperidol and clozapine on [(3)H]cAMP binding, protein kinase A (PKA) activity, and mRNA and protein expression of selective regulatory and catalytic subunit isoforms of PKA in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 301(1):197-209.
- Eccles JC. 1953**  
*The neuropsychological basis of mind: The principles of neurophysiology*. Oxford: Clarendon press
- Eccles JC. 1970**  
*Facing reality: philosophical adventures of a brain scientist*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. pp 210
- Eccles JC. 1977**  
La memoria consciente: Procesos cerebrales implicados en el almacenamiento y recuperación. En (Popper K. & Eccles JC.) *The self and its brain*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. pp 424-455
- English JD, Sweatt JD. 1996**  
Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation.  
*J Biol Chem*. 271(40):24329-32.
- Erichman J, Rosenfeld R, Rosen OM. 1974**  
Phosphorylation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem*. 249(15):5000-3.
- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Haganir RL, Malinow R. 2003**  
PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci*. 6(2):136-43.
- Farley J, Schuman E. 1991**  
Protein kinase C inhibitors prevent induction and continued expression of cell memory in Hermissenda type B photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(5):2016-20.
- Faux MC, Scott JD. 1996**  
Molecular glue: kinase anchoring and scaffold proteins. *Cell*. 85(1):9-12.
- Feany MB, Quinn WG. 1995**  
A neuropeptide gene defined by the Drosophila memory mutant *amnesiac*.  
*Science*.;268(5212):869-73.
- Fiala A, Müller U, Menzel R. 1999**  
Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*.  
*J Neurosci*. 19(22):10125-34.
- Flexner JB, Flexner LB, Stellar E. 1983**  
Memory in mice is affected by intracerebral puromycin. *Science* 141:57-59

- Foster JL, Guttman JJ, Hall LM, Rosen OM. 1984**  
Drosophila cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 259(21):13049-55.
- Freeman FM, Rose SP, Scholey AB. 1995**  
Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem.* 63(3):291-5.
- Frenkel L, Freudenthal R, Romano A, Nahmod VE, Maldonado H, Delorenzi A. 2002**  
Angiotensin II and the transcription factor Rel/NF-kappaB link environmental water shortage with memory improvement. *Neuroscience.* 115(4):1079-87.
- Freudenthal R, Locatelli F, Hermitte G, Maldonado H, Lafourcade C, Delorenzi A, Romano A. 1998**  
Kappa-B like DNA-binding activity is enhanced after spaced training that induces long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neurosci Lett.* 242(3):143-6.
- Freudenthal R, Romano A. 2000**  
Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res.* 855(2):274-81.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER. 1993**  
Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science.* 260(5114):1661-4.
- Frey U, Morris RG. 1998**  
Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 21(5):181-8.
- Frieder B, Allweis C. 1978**  
Transient hypoxic-amnesia: evidence for a triphasic memory-consolidating mechanism with parallel processing. *Behav Biol.* 22(2):178-89.
- Gereau RW 4th, Conn PJ. 1994**  
A cyclic AMP-dependent form of associative synaptic plasticity induced by coactivation of beta-adrenergic receptors and metabotropic glutamate receptors in rat hippocampus. *J Neurosci.* 14(5 Pt 2):3310-8.
- Ghirardi M, Braha O, Hochner B, Montarolo PG, Kandel ER, Dale N. 1992**  
Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron.* 9(3):479-89.
- Gibbs ME, Ng KT. 1977**  
Counteractive effects of norepinephrine and amphetamine on quabain-induced amnesia. *Pharmacol Biochem Behav.* 6(5):533-7.
- Gill GN, Garren LD. 1970**  
A cyclic-3',5'-adenosine monophosphate dependent protein kinase from the adrenal cortex: comparison with a cyclic AMP binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 39(3):335-43.
- Gilman AG 1995**  
Nobel lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep* 15:65-97
- Gjertsen BT, Mellgren G, Otten A, Maronde E, Genieser HG, Jastorff B, Vintemyr OK, McKnight GS, Døskeland SO. 1995**  
Novel (Rp)-cAMPS analogs as tools for inhibition of cAMP-kinase in cell culture. Basal cAMP-kinase activity modulates interleukin-1 beta action *J Biol Chem.* 270(35):20599-607.
- Glantz RM, McIsaac A. 1998**  
Two-channel polarization analyzer in the sustaining fiber-dimming fiber ensemble of crayfish visual system. *J Neurophysiol.* 80(5):2571-83.
- Glanzman DL, Mackey SL, Hawkins RD, Dyke AM, Lloyd PE, Kandel ER. 1989**  
Depletion of serotonin in the nervous system of *Aplysia* reduces the behavioral enhancement of gill withdrawal as well as the heterosynaptic facilitation produced by tail shock. *J Neurosci.* 9(12):4200-13.

- Gleeson RA, Zubkoff PL 1977**  
The determination of hemolymph volume in the blue crab *Callinectes sapidus*, utilizing 14 C-thiocyanate. *Comp Biochem and Physiol A* 56:411-413
- Godoy AM, Maldonado H. 1995**  
Modulation of the escape response by [D-Ala<sup>2</sup>]Met-enkephalin in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav.* 50(3):445-51.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. 1986**  
The long and the short of long-term memory – a molecular framework. *Nature* 322:419-422
- Gold PE, McGaugh JL. 1977**  
Hormones and memory. *Adv Biochem Psychopharmacol* 17:127-43.
- Goldman-Rakic PS. 1992**  
Working memory and the mind. *Sci Am* 267(3):110-7
- Golski S, Olds JL, Mishkin M, Olton DS, Alkon DL. 1995**  
Protein kinase C in the hippocampus is altered by spatial but not cued discriminations: a component task analysis. *Brain Res.* 676(1):53-62.
- Goodwin SF, Del Vecchio M, Velinzon K, Hogel C, Russell SR, Tully T, Kaiser K. 1997**  
Defective learning in mutants of the *Drosophila* gene for a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci.* 17(22):8817-27.
- Gottschalk W, Pozzo-Miller LD, Figuero A, Lu B. 1998**  
Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus. *J Neurosci.* 18(17):6830-9.
- Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER. 1992**  
Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science.* 258(5090):1903-10
- Graves JD, Campbell JS, Krebs EG. 1995**  
Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. *Ann N Y Acad Sci.* 766:320-43.
- Grecksch G, Matthies H. 1980**  
Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav.* 12(5):663-5.
- Greenberg SM, Castellucci VF, Bayley H, Schwartz JH. 1987**  
A molecular mechanism for long-term sensitization in *Aplysia*. *Nature.* 329(6134):62-5.
- Greenough WT. 1984**  
Structural correlates of information storage in the mammalian brain: A review and hypothesis. *Trends in neurosci* 7: 229-233.
- Griffith LC, Verselis LM, Aitken KM, Kyriacou CP, Danho W, Greenspan RJ. 1993**  
Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase in *Drosophila* disrupts behavioral plasticity. *Neuron.* 10(3):501-9.
- Grünbaum L, Müller U. 1998**  
Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci.* 18(11):4384-92.
- Guillou JL, Micheau J, Jaffard R. 1998**  
The opposite effects of cysteamine on the acquisition of two different tasks in mice are associated with bidirectional testing-induced changes in hippocampal adenylyl cyclase activity. *Behav Neurosci.* 112(4):900-8.
- Guillou JL, Rose GM, Cooper DM. 1999**  
Differential activation of adenylyl cyclases by spatial and procedural learning. *J Neurosci.* 19(14):6183-90.

**Gupta A. 1997.**

Evolutionary trends in the central and mushroom bodies of the arthropod brain. A dilemma. En (Gupta ed) *Arthropod brain. Its evolution development, structure and functions*. New York: Willey and sons

**Guzowski JF, McGaugh JL. 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 U S A.* 94(6):2693-8.

**Hamm HE, Gilchrist A. 1996**

Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 8(2):189-96

**Hammer M, Menzel R. 1995 a**

Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci.* 18(5):212-8.

**Hammer M, Menzel R. 1995 b**

Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci.* 15(3 Pt 1):1617-30.

**Han JD, Baker NE, Rubin CS. 1997**

Molecular characterization of a novel A kinase anchor protein from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem.* 272(42):26611-9.

**Hanström B 1947.**

The brain, the sense organs and the incretory organs of the head in the crustacea malacostraca. *Acta Univ Lund Adv 2NF* 43:1-44

**Hawkins RD, Abrams TW, Carew TJ, Kandel ER. 1983**

A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science.* 219(4583):400-5.

**Hebb DO. 1949.**

*The organization of behavior*. New York: Willey

**Hegde AN, Goldberg AL, Schwartz JH. 1993**

Regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(16):7436-40.

**Hegde AN, Inokuchi K, Pei W, Casadio A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER, Schwartz JH. 1997**

Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell.* 89(1):115-26.

**Hermite G, Pedreira ME, Tomsic D, Maldonado H. 1999**

Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem.* 71(1):34-49.

**Hildebrandt H, Müller U. 1995a**

PKA activity in the antennal lobe of honeybees is regulated by chemosensory stimulation in vivo. *Brain Res.* 679(2):281-8.

**Hildebrandt H, Müller U. 1995b**

Octopamine mediates rapid stimulation of protein kinase A in the antennal lobe of honeybees. *J Neurobiol.* 27(1):44-50.

**Hoeger U, Florey E. 1989**

Catecholamine degradation in the hemolymph in the chinese crab, *Eriocheir Sinensis*. *Comp Biochem Physiol C* 92:323-327

**Hofmann F, Bechtel PJ, Krebs EG. 1977**

Concentrations of cyclic AMP-dependent protein kinase subunits in various tissues. *J Biol Chem.* 252(4):1441-7.

- Hoover F, Kalhovde JM, Dahle MK, Skalhegg B, Tasken K, Lomo T. 2002**  
Electrical muscle activity pattern and transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate PKA subunit expression in rat skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci.* 19(2):125-37.
- Hopkins WF, Johnston D. 1988**  
Noradrenergic enhancement of long-term potentiation at mossy fiber synapses in the hippocampus. *J Neurophysiol.* 59(2):667-87.
- Houge G, Vinttermyr OK, Doskeland SO. 1990**  
The expression of cAMP-dependent protein kinase subunits in primary rat hepatocyte cultures. Cyclic AMP down-regulates its own effector system by decreasing the amount of catalytic subunit and increasing the mRNAs for the inhibitory (R) subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol.* 4(3):481-8.
- Hu Y, Barzilai A, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. 1993**  
5-HT and cAMP induce the formation of coated pits and vesicles and increase the expression of clathrin light chain in sensory neurons of *Aplysia*. *Neuron.* 10(5):921-9.
- Huang YY, Kandel ER, Varshavsky L, Brandon EP, Qi M, Idzerda RL, McKnight GS, Bourtchouladze R. 1995**  
A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning. *Cell.* 83(7):1211-22.
- Huang YY, Kandel ER. 1994**  
Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn Mem.* 1(1):74-82.
- Huang YY, Kandel ER. 1995**  
D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(7):2446-50.
- Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS. 1997**  
Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J Biol Chem.* 272(12):8057-64.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, 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.
- Inoue H, Yoshioka T. 1997**  
Purification of a regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from *Drosophila* heads. *Biochem Biophys Res Commun.* 235(1):223-6.
- Ishikawa E, Ishikawa S, Davis JW, Sutherland EW. 1969**  
Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J Biol Chem.* 244(23):6371-6. cap 6
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. 1998**  
Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393(6686):635-6
- Jacobowitz O, Chen J, Premont RT, Iyengar R. 1993**  
Stimulation of specific types of Gs-stimulated adenylyl cyclases by phorbol ester treatment. *J Biol Chem.* 268(6):3829-32.
- Jahnsen T, Lohmann SM, Walter U, Hedin L, Richards JS. 1985**  
Purification and characterization of hormone-regulated isoforms of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovaries. *J Biol Chem.* 260(29):15980-7.
- Jahnsen T, Hedin L, Kidd VJ, Beattie WG, Lohmann SM, Walter U, Durica J, Schulz TZ, Schiltz E, Browner M, et al. 1986**  
Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem.* 261(26):12352-61.
- James W, 1890.**  
*Principles of psychology.* New York: Holt

**Kaang BK, Kandel ER, Grant SG. 1993**

Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*. 10(3):427-35.

**Kalderon D, Rubin GM. 1988**

Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes. *Genes Dev*. 2(12A):1539-56.

**Kamemoto F 1991.**

Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs *Zoological science* 8:827-833

**Kandel ER, Schwartz JH. 1982**

Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*. 218(4571):433-43.

**Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. 1998**

A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 282(5397):2275-9.

**Kemp BE, Graves DJ, Benjamini E, Krebs EG. 1977**

Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 252(14):4888-94.

**Kennedy TE, Kuhl D, Barzilai A, Sweatt JD, Kandel ER. 1992**

Long-term sensitization training in *Aplysia* leads to an increase in calreticulin, a major presynaptic calcium-binding protein. *Neuron*. 9(6):1013-24.

**Klann E, Chen SJ, Sweatt JD. 1991**

Persistent protein kinase activation in the maintenance phase of long-term potentiation. *J Biol Chem* 266(36):24253-6

**Klein M, Kandel ER. 1980**

Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 77(11):6912-6.

**Knutsen HK, Tasken K, Eskild W, Richards JS, Kurten RC, Torjesen PA, Jahnsen T, Hansson V, Guerin S, Tasken KA. 1997**

Characterization of the 5'-flanking region of the gene for the cAMP-inducible protein kinase A subunit, RIIbeta, in Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*. 129(1):101-14.

**Knutsen HK, Tasken KA, Eskild W, Jahnsen T, Hansson V. 1991**

Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent stabilization of messenger ribonucleic acids (mRNAs) for protein kinase-A (PKA) subunits in rat Sertoli cells: rapid degradation of mRNAs for PKA subunits is dependent on ongoing RNA and protein synthesis. *Endocrinology*. 129(5):2496-502.

**Konorski J. 1948.**

*Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge England: Cambridge univ press

**Krasne FB. 1978**

Extrinsic control of intrinsic neuronal plasticity: an hypothesis from work on simple systems. *Brain Res* 140(2):197-216.

**Kuhl D, Kennedy TE, Barzilai A, Kandel ER. 1992**

Long-term sensitization training in *Aplysia* leads to an increase in the expression of BiP, the major protein chaperon of the ER. *J Cell Biol*. 119(5):1069-76.

**Kumon A, Yamamura H, Nishizuka Y. 1970**

Mode of action of adenosine 3',5'-cyclic phosphate on protein kinase from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 41(5):1290-7.

**Kuo JF, Greengard P. 1969**

Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 64(4):1349-55.

**Langan TA. 1968**

Histone phosphorylation: stimulation by adenosine 3',5'-monophosphate.  
*Science* 162(853):579-80.

**Lashley KS. 1950**

In search of the engram *Symposia of the society for experimental biology* 4: 454-482

**Lauder JM. 1993**

Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers.  
*Trends Neurosci.* 6(6):233-40

**Lee K, Schottler F, Oliver M, Lynch GS. 1980**

Brief bursts of high-frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 44:247-258.

**Lee DC, Carmichael DF, Krebs EG, McKnight GS. 1983**

Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(12):3608-12.

**Levy FO, Ree AH, Eikvar L, Govindan MV, Jahnsen T, Hansson V. 1989**

Glucocorticoid receptors and glucocorticoid effects in rat Sertoli cells.  
*Endocrinology.* 124(1):430-6.

**Lin AH, Onyike CU, Abrams TW. 1998**

Sequence-dependent interactions between transient calcium and transmitter stimuli in activation of mammalian brain adenylyl cyclase. *Brain Res* 800:300-307

**Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P. 1997**

Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci.* 9(12):2581-7.

**Lisman J. 1994**

The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory.  
*Trends Neurosci.* 17(10):406-12.

**Liu JP. 1996**

Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* 116(1):1-29.

**Livingstone MS, Sziber PP, Quinn WG. 1984**

Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37(1):205-15.

**Lopez-Salon M, Alonso M, Vianna MR, Viola H, Mello e Souza T, Izquierdo I, Pasquini JM, Medina JH. 2001**

The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation.  
*Eur J Neurosci.* 14(11):1820-6.

**Lozada M, Romano A, Maldonado H. 1990**

Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*.  
*Physiol Behav.* 47(1):35-41.

**Lu YM, Roder JC, Davidow J, Salter MW. 1998**

Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons.  
*Science.* 279(5355):1363-7.

**Lugaro E. 1900**

I recenti progressi dell' anatomia del sistema nervoso in rapporto alla psicologia ed alla psichiatria. *Riv Sper Freniatr Med Leg Alienazione ment* 26:831-894

**Mackintosh NJ. 1975**

Theory of attention. Variations in the associability of stimulus with reinforcement.  
*Psychol Rev* 82:276-298.

**Maldonado H, Romano A, Lozada M. 1989**

Opioid action on response level to a danger stimulus in the crab (*Chasmagnathus granulatus*). *Behav Neurosci.* 103(5):1139-43.

**Maldonado H, Romano A, Tomsic D. 1997**

Long-term habituation (LTH) in the crab *Chasmagnathus*: a model for behavioral and mechanistic studies of memory. *Braz J Med Biol Res.*30(7):813-26.

**Malenka RC. 1994**

Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78(4):535-8

**Mane SD, Darvilie RG, Sauer JR, Essenberg RC 1985**

Cyclic AMP dependent protein kinase from salivary glands of the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem* 15:777-787

**Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad M, Casadio A, Zhu H, Kandel ER. 1997**

MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron*. 18(6):899-912.

**Matthies H, Reymann KG. 1993**

Protein kinase A inhibitors prevent the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Neuroreport*. 4(6):712-4.

**McGaugh JL. 1966**

Time-dependent processes in memory storage. *Science*. 153(742):1351-8.

**McGaugh JL. 1983**

Hormonal influences on memory. *Annu Rev Psychol* 34:297-323.

**McGaugh JL. 1999**

The perseveration-consolidation hypothesis: Mueller and Pilzecker, 1900. *Brain Res Bull*. 50(5-6):445-6.

**Menzel R. 1999.**

Memory Dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185:323-340

**Menzel R, Durst C, Erber J, Eichmüller S, Hammer M, Hildebrandt H, Mauelshagen J,**

**Müller U, Rosenboom H, Rybak J, Schäfer S, Scheidler A 1994.**

The mushroom bodies in the honeybee: from molecules to behaviour. En (Schilderberg K, Elsner N eds) *Neural basis of behavioural adaptations*. Fortschritte der Zoologie Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, Band/ Vol 39 pp 81-103

**Menzel R, Müller U. 2001**

Neurobiology. Learning from a fly's memory. *Nature*. 411(6836):433-4.

**Menzel R. 2001**

Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem*. 8(2):53-62.

**Merlo E, Freudenthal R, Romano A. 2002**

The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 112(1):161-72.

**Michael D, Martin KC, Seger R, Ning MM, Baston R, Kandel ER. 1998**

Repeated pulses of serotonin required for long-term facilitation activate mitogen-activated protein kinase in sensory neurons of *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(4):1864-9.

**Micheau J, Riedel G. 1999**

Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci*. 55(4):534-48.

**Müller GE. & Pilzecker A. 1900**

Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. *Zeitschrift für Psychologie* 1:1-288

**Müller U, Carew TJ. 1998**

Serotonin induces temporally and mechanistically distinct phases of persistent PKA activity in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*. 21(6):1423-34.

**Müller U. 1997**

Neuronal cAMP-dependent protein kinase type II is concentrated in mushroom bodies of *Drosophila melanogaster* and the honeybee *Apis mellifera*. *J Neurobiol*. 33(1):33-44.

**Müller U. 2000**

Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron*. 27(1):159-68.

**Müller U, Spatz HC 1989**

Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolytic modification of the CAMP-dependent protein kinase in *Drosophila* wild-type and *dunce* memory mutants *J Neurogenet* 6: 95-114

**Nalbach HO 1990**

Visually elicited escape in crabs. En: *Frontiers in crustacean neurobiology*. Basel: Birkhauser Verlag pp165-171

**Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000**

Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 406(6797):722-6.

**Nakamura T, Gold GH. 1987**

A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*. 325(6103):442-4.

**Nässel DR, Elosfsson R. 1987.**

Comparative anatomy of the crustacean brain. En (Gupta A ed) *Arthropod brain. Its evolution, development, structure and functions* New York: Willey and Sons

**Nesterova M, Cho-Chung YS.1995**

A single-injection protein kinase A-directed antisense treatment to inhibit tumour growth. *Nat Med*. Jun;1(6):528-33.

**Nesterova M, Cho-Chung YS. 2000**

Oligonucleotide sequence-specific inhibition of gene expression, tumor growth inhibition, and modulation of cAMP signaling by an RNA-DNA hybrid antisense targeted to protein kinase A RIalpha subunit. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 10(6):423-33.

**Nesterova M, Noguchi K, Park YG, Lee YN, Cho-Chung YS. 2000**

Compensatory stabilization of RIIbeta protein, cell cycle deregulation, and growth arrest in colon and prostate carcinoma cells by antisense-directed down-regulation of protein kinase A RIalpha protein. *Clin Cancer Res*. 6(9):3434-41.

**Nguyen PV, Kandel ER. 1996**

A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci*. 16(10):3189-98

**Nishimoto RT, Herrnkind WF. 1978**

Directional orientacion in blue crabs, *Callinectis sapidus* Rathbum: Escape responses and influence of wave direction. *J Exp Mar Biol Ecol* 33:93-112

**Nowak I, Seipel K, Schwarz M, Jans DA, Hemmings BA. 1987**

Isolation of a cDNA and characterization of the 5' flanking region of the gene encoding the type I regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *Eur J Biochem*. 167(1):27-33.

**O'Dell TJ, Kandel ER, Grant SG. 1991**

Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 353(6344):558-60.

**Otten AD, McKnight GS. 1989**

Overexpression of the type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase eliminates the type I holoenzyme in mouse cells. *J Biol Chem*. 264(34):20255-60.

**Otten AD, Parenteau LA, Doskeland S, McKnight GS. 1991**

Hormonal activation of gene transcription in ras-transformed NIH3T3 cells overexpressing RII alpha and RII beta subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 266(34):23074-82.

**Oyen O, Myklebust F, Scott JD, Hansson V, Jahnsen T. 1989**

Human testis cDNA for the regulatory subunit RII alpha of cAMP-dependent protein kinase encodes an alternate amino-terminal region. *FEBS Lett*. 246(1-2):57-64.

- Oyen O, Sandberg M, Eskild W, Levy F, Knutsen G, Beebe S, Hansson V, Jahnsen T. 1988**  
Differential regulation of messenger ribonucleic acids for specific subunits of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase by cAMP in rat Sertoli cells. *Endocrinology*. 122(6):2658-66.
- Palazzolo M, Katz F, Kennedy TE, Schwartz JH. 1989**  
Multiple cAMP-binding proteins in Aplysia tissues. *J Neurobiol*. 20(8):746-61.
- Palmer WK, McPherson JM, Walsh DA. 1980**  
Critical controls in the evaluation of cAMP-dependent protein kinase activity ratios as indices of hormonal action. *J Biol Chem*. 255(7):2663-6.
- Panchal RG, Cheley S, Bayley H. 1994**  
Differential phosphorylation of neuronal substrates by catalytic subunits of *Aplysia* cAMP-dependent protein kinase with alternative N termini. *J Biol Chem*. 269(38):23722-30.
- Pawson T, Scott JD. 1997**  
Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*. 278(5346):2075-80.
- Pearse JM, Hall G. 1980.**  
A model for pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of conditioned but not unconditioned stimulus *Psychol Rev*. 87, 532-552
- Pedarzani P, Storm JF. 1995**  
Protein kinase A-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(25):11716-20.
- Pedreira ME, Dimant B, Maldonado H. 1996**  
Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav*. 54(3):611-7.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, 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):8305-11.
- Pedreira ME, Romano A, Tomsic D, Lozada M, Maldonado H. 1997**  
Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Animal learning and behavior* 26(1):34-45
- Peeke HVS, Veno A 1976.**  
Response independent habituation of territorial aggression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Zeitschrift fur tierpsychologie* 40:53-58
- Pereyra P, De La Iglesia HO, Maldonado H. 1996**  
Training-to-testing intervals different from 24 h impair habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Physiol Behav*. 59(1):19-25.
- Pereyra P, Gonzalez Portino E, Maldonado H. 2000**  
Long-lasting and context-specific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem*. 74(2):119-34.
- Qi M, Zhuo M, Skalhegg BS, Brandon EP, Kandel ER, McKnight GS, Idzerda RL. 1996**  
Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(4):1571-6.
- Ramon y Cajal S. 1894**  
La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc Lond (Biol)* 55:444-468
- Rangel-Aldao R, Rosen OM. 1976**  
Dissociation and reassociation of the phosphorylated and nonphosphorylated forms of adenosine 3':5' -monophosphate-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem*. 251(11):3375-80.

- Rangel-Aldao R, Rosen OM.**  
Effect of cAMP and ATP on the reassociation of phosphorylated and nonphosphorylated subunits of the cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. 1977 *J Biol Chem.* 252(20):7140-5
- Reimann EM, Walsh DA, Krebs EG. 1971**  
Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 246(7):1986-95
- Rescorla DA, Holland PC. 1976**  
Some behavioral approaches to the study of learning. En: (M R. Rosenzweig & E. L. Bennet eds) *Neural mechanisms of learning and memory.* Cambridge MIT press. pag 185-189
- Rescorla DA, Wagner AR. 1972**  
En classical conditioning II: current research and theory (Blak AH & Prokasky, WF eds) New York:Appleton century Crofts pag 64-99
- Rescorla DA. 1988**  
Pavlovian conditioning: It is not what you think it is. *American Psychologist* 43:151-160
- Richards JS, Rolfes AI. 1980**  
Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. Characterization by photoaffinity labeling. *J Biol Chem.* 255(11):5481-9.
- Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Kondratick C, Sweatt JD. 1999**  
The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci.* 19(11):4337-48.
- Roberson ED, English JD, Sweatt JD. 1996**  
A biochemist's view of long-term potentiation. *Learn Mem* 3(1):1-24
- Roberson ED, Sweatt JD. 1996**  
Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *J Biol Chem.* 271(48):30436-41.
- Romano A, Delorenzi A, Pedreira ME, Tomsic D, Maldonado H. 1996a**  
Acute administration of a permeant analog of cAMP and a phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res.* 75(1-2):119-25.
- Romano A, Locatelli F, Delorenzi A, Pedreira ME, Maldonado H. 1996b**  
Effects of activation and inhibition of cAMP-dependent protein kinase on long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res.* 735(1):131-40.
- Romano A, Lozada M, Maldonado H. 1990**  
Effect of naloxone pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Behav Neural Biol.* 53(1):113-22.
- Rosenblum K, Schul R, Meiri N, Hadari YR, Zick Y, Dudai Y. 1995**  
Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(4):1157-61.
- Rosenzweig MR, Bennett EL. 1978**  
Experimental influences on brain anatomy and brain chemistry in rodents. En: *Studies on the development of behavior and the nervous system*, vol 4 (G. Gottlieb ed). New York Academic Press, pag 289-327.
- Roskoski R Jr. 1983**  
Assays of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99:3-6.
- Russell WR 1971.**  
*The traumatic amnesias.* New York: Oxford Univ Press
- Russell WR, Nathan TW. 1946**  
Traumatic amnesia. *Brain* 69: 183-187

**Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, 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.

**Sandberg M, Tasken K, Oyen O, Hansson V, Jahnsen T. 1987**

Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from human testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 149(3):939-45.

**Sandeman DC 1982**

Organization of central nervous system. En (Sandeman, Atwood ed) *The biology of the crustacea* Vol IV. Academic press pp1-31

**Sandeman DC, Sandeman RE, Derby C, Schmidt M 1992**

Morphology of the brain, Crayfish, Crabs and Spiny lobsters: A common nomenclature for homologous structures *Biol Bull* 183:304-326

**Sandeman DC, Scholtz G, Sandeman RE 1993**

Brain evolution in decapod crustacea *J Exp Zool* 265:112-133

**Sandeman DC. 1967**

The vascular circulation in the brain, optic lobes and thoracic ganglia of the crab *Carcinus*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 168(10):82-90

**Sara SJ. 2000**

Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.* 7(2):73-84

**Scholey AB, Rose SP, Zamani MR, Bock E, Schachner M. 1993**

A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis six hours following passive avoidance training of the young chick. *Neuroscience.* 55(2):499-509.

**Schramm M, Selinger Z. 1984**

Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system. *Science.* 225(4668):1350-6.

**Schulman H. 1995**

Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. *Curr Opin Neurobiol.* 5(3):375-81.

**Schulz S, Siemer H, Krug M, Holtt V. 1999**

Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 19(13):5683-92.

**Schumacher H, Muller D, Mukhopadhyay AK. 1992**

Stimulation of testosterone production by atrial natriuretic peptide in isolated mouse Leydig cells results from a promiscuous activation of cyclic AMP-dependent protein kinase by cyclic GMP. *Mol Cell Endocrinol.* 90(1):47-52.

**Schwartz DA, Rubin CS. 1983**

Regulation of cAMP-dependent protein kinase subunit levels in Friend erythroleukemic cells. Effects of differentiation and treatment with 8-Br-cAMP and methylisobutyl xanthine. *J Biol Chem.* 258(2):777-84.

**Schwartz JH, Greenberg SM. 1987**

Molecular mechanisms for memory: second-messenger induced modifications of protein kinases in nerve cells. *Annu Rev Neurosci.* 10:459-76.

**Scott JD, McCartney S. 1994**

Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Mol Endocrinol.* 8(1):5-11.

**Scott JD, Glaccum MB, Zoller MJ, Uhler MD, Helfman DM, McKnight GS, Krebs EG. 1987**

The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(15):5192-6.

- Scoville WB, Milner B. 1957**  
Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.  
*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21
- Sedman G, O'Dowd B, Rickard N, Gibbs ME, Ng KT. 1991**  
Brain metabolic activity associated with long-term memory consolidation.  
*Mol Neurobiol* 5(2-4):351-4.
- Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt JD. 1999**  
A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning.  
*Learn Mem.* 6(5):478-90.
- Serrano PA, Beniston DS, Oxonian M, Rodriguez WA, Rosenzweig MR, Bennett EL. 1994**  
Differential effects of protein kinase inhibitors and activators on memory formation in the 2-day-old chick. *Behav Neural Biol.* 61(1):60-72.
- Sherrington C. 1940.**  
*Man on his nature.* Cambridge: Cambridge univ press
- Shirakawa F, Chedid M, Suttles J, Pollok BA, Mizel SB. 1989**  
Interleukin 1 and cyclic AMP induce kappa immunoglobulin light-chain expression via activation of an NF-kappa B-like DNA-binding protein. *Mol Cell Biol.* 9(3):959-64.
- Shirakawa F, Mizel SB. 1989**  
In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol Cell Biol* 9(6):2424-30.
- Skalhegg BS, Landmark BF, Doskeland SO, Hansson V, Lea T, Jahnsen T. 1992**  
Cyclic AMP-dependent protein kinase type I mediates the inhibitory effects of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate on cell replication in human T lymphocytes.  
*J Biol Chem.* 267(22):15707-14.
- Skalhegg BS, Tasken K. 2000**  
Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5:D678-93.
- Skoulakis EM, Kalderon D, Davis RL. 1993**  
Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory.  
*Neuron.* 11(2):197-208.
- Slack JR, Pockett S 1991**  
Cyclic AMP induces long-term increase in synaptic efficacy in CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci lett* 130(1): 69-72
- Solberg R, Tasken K, Keiserud A, Jahnsen T. 1991**  
Molecular cloning, cDNA structure and tissue-specific expression of the human regulatory subunit RI beta of cAMP-dependent protein kinases.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 176(1):166-72.
- Solberg R, Sandberg M, Natarajan V, Torjesen P, Hansson V, Jahnsen T, Tasken K. 1997**  
The human gene for the regulatory subunit RI alpha of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase: two distinct promoters provide differential regulation of alternately spliced messenger ribonucleic acids. *Endocrinology.* 138(1):169-81.
- Squire LR, 1987.**  
*Memory and brain,* New York: Oxford Univ press
- Stanton PK, Sarvey JM. 1985**  
The effect of high-frequency electrical stimulation and norepinephrine on cyclic AMP levels in normal versus norepinephrine-depleted rat hippocampal slices. *Brain Res* 358(1-2):343-8.
- Strausfeld NJ, Nässel DR 1980.**  
Neuroarchitecture of the brain regions that subserve eyes of crustacea and insect. En (Atrim H ed) *Handbook of sensory Physiology.* Vol II: Vision in invertebrates, Berlin: Springer Verlag pp1-132

**Sutton MA, Masters SE, Bagnall MW, Carew TJ. 2001**

Molecular mechanisms underlying a unique intermediate phase of memory in aplysia. *Neuron*. 31(1):143-54.

**Sweatt JD, Kandel ER. 1989**

Persistent and transcriptionally-dependent increase in protein phosphorylation in long-term facilitation of *Aplysia* sensory neurons. *Nature*. 339(6219):51-4.

**Sweatt JD. 2001**

The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*. 76(1):1-10.

**Szapiro G, Izquierdo LA, Alonso M, Barros D, Paratcha G, Ardenghi P, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I. 2000**

Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*. 99(1):1-5.

**Szentagothai J. 1971.**

*Memory functions and the structural organizations of the brain* (Adam ed) pp21-25

**Tan SE, Liang KC. 1997**

Inhibitory avoidance learning alters the amygdala calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain Res*. 748(1-2):227-33

**Tanaka C, Nishizuka Y. 1994**

The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci* 17:551-67.

**Tang WJ, Gilman AG. 1991**

Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*. 254(5037):1500-3.

**Tanzi E. 1893**

I fatti e le induzioni nell' odierna istologia del sistema nervosa. *Riv Sper Freniatr Med Leg Alienazione ment* 19:419-472

**Tao M, Salas ML, Lipmann F. 1970**

Mechanism of activation by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67(1):408-14

**Tasken K, Andersson K, Skalhegg B, Tasken K, Hansson V, Jahnsen T, Blomhoff H. 1993**

Reciprocal regulation of mRNA and protein for subunits of cAMP-dependent protein kinase (RI alpha and C alpha) by cAMP in a neoplastic B cell line (Reh). *J Biol Chem*. 268(31):23483-9.

**Tasken KA, Knutsen HK, Attramadal H, Tasken K, Jahnsen T, Hansson V, Eskild W. 1991**

Different mechanisms are involved in cAMP-mediated induction of mRNAs for subunits of cAMP-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol*. 5(1):21-8.

**Teyler TJ, Cavus I, Coussens C, DiScenna P, Grover L, Lee YP, Little Z. 1994**

Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*. 4(6):623-34.

**Thorpe WH. 1963.**

The concepts of learning and their relation to those of instinct. Physiological mechanism in animal behavior symposium. *Soc Exp Biol* 4:387-408,

**Tiunova AA, Anokhin KV, Rose SP. 1998**

Two critical periods of protein and glycoprotein synthesis in memory consolidation for visual categorization learning in chicks. *Learn Mem*. 4(5):401-10.

**Tomsic D, Maldonado H, Rakitin A. 1991**

Morphine and GABA: effects on perception, escape response and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull*. 26(5):699-706.

- Tomsic D, Maldonado H. 1990**  
Central effect of morphine pretreatment on short- and long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav.* 36(4):787-93.
- Tomsic D, Massoni V, Maldonado. 1993**  
Habituation to a danger stimulus in two semiterrestrial crabs: Ontogenic ecological and opioid modulation correlates. *J Comp Physiol* 173:621-633
- Tomsic D, Romano A, Maldonado H. 1998**  
Behavioral and mechanistic bases of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Adv Exp Med Biol.* 446:17-35.
- Torgersen KM, Vaage JT, Levy FO, Hansson V, Rolstad B, Tasken K. 1997**  
Selective activation of cAMP-dependent protein kinase type I inhibits rat natural killer cell cytotoxicity. *J Biol Chem.* 272(9):5495-500.
- Troncoso J, Maldonado H. 2002**  
Two related forms of memory in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by NMDA receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav.* 72(1-2):251-265.
- Tully T. 1997**  
Regulation of gene expression and its role in long-term memory and synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(9):4239-41.
- Turner AM, Greenough WT. 1985**  
Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res* 329:195-203
- Uhler MD, Carmichael DF, Lee DC, Chrivia JC, Krebs EG, McKnight GS. 1986**  
Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc Nat Acad Sci USA* 83:1300-1304
- Uhler MD, Chrivia JC, McKnight GS. 1986**  
Evidence for a second isoform of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 261: 15360-15363
- Uzzan A, Dudai Y. 1982**  
Aminergic receptors in *Drosophila melanogaster*: responsiveness of adenylate cyclase to putative neurotransmitters. *J Neurochem.* 38(6):1542-50.
- Van der Zee EA, Compaan JC, de Boer M, Luiten PG. 1992**  
Changes in PKC gamma immunoreactivity in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *J Neurosci.* 12(12):4808-15.
- Van der Zee EA, Luiten PG, Disterhoft JF. 1997**  
Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 21(3):531-72.
- Van Sande J, Lefort A, Beebe S, Roger P, Perret J, Corbin J, Dumont JE. 1989**  
Pairs of cyclic AMP analogs, that are specifically synergistic for type I and type II cAMP-dependent protein kinases, mimic thyrotropin effects on the function, differentiation expression and mitogenesis of dog thyroid cells. *Eur J Biochem.* 183(3):699-708.
- Vardanis A. 1980**  
A unique cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 255(15):7238-43.
- Vazquez SI, Vazquez A, Peña de Ortiz S. 2000**  
Different hippocampal activity profiles for PKA and PKC in spatial discrimination learning. *Behav Neurosci.* 114(6):1109-18.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. 2000**  
Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 7(5):333-40.

**Walsh DA, Ashby CD, Gonzalez C, Calkins D, Fischer EH, Krebs EG. 1971**

Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 10;246(7):1977-85

**Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. 1968**

An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*. 243(13):3763-5.

**Wiersma CAG, Roach JLM, Glantz RM. 1982**

Neural integration of the optic system. En (Sandeman, Atwood eds) *The biology of crustacea* Vol IV. Academic press pp1-31

**Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA. 1994**

Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science*. 265(5180):1878-82.

**Wolfman C, Fin C, Dias M, Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I. 1994**

Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav Neural Biol*. 61(3):203-5.

**Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ, Storm DR. 1999**

Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron*. 23(4):787-98.

**Woo NH, Duffy SN, Abel T, Nguyen PV. 2000**

Genetic and pharmacological demonstration of differential recruitment of cAMP-dependent protein kinases by synaptic activity. *J Neurophysiol*. 84(6):2739-45.

**Yin JC, Del Vecchio M, Zhou H, Tully T. 1995**

CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell*. 81(1):107-15.

**Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H, Quinn WG, Tully T. 1994**

Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*. 79(1):49-58.

**Yovell Y, Kandel ER, Dudai Y, Abrams TW. 1987**

Biochemical correlates of short-term sensitization in *Aplysia*: temporal analysis of adenylyl cyclase stimulation in a perfused-membrane preparation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(24):9285-9.

**Zars T, Wolf R, Davis R, Heisenberg M. 2000**

Tissue-specific expression of a type I adenylyl cyclase rescues the rutabaga mutant memory defect: in search of the engram. *Learn Mem*. 7(1):18-31.

**Zhao WQ, Sedman GL, Gibbs ME, Ng KT. 1994**

Effect of PKC inhibitors and activators on memory. *Behav Brain Res*. 60(2):151-60.

**Zhao WQ, Polya GM, Wang BH, Gibbs ME, Sedman GL, Ng KT. 1995**

Inhibitors of cAMP-dependent protein kinase impair long-term memory formation in one day-old chicks. *Neurobiol Learn Mem*. 64(2):106-18.

**Zhong H, Voll RE, Ghosh S. 1998**

Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. 1(5):661-71.

**Zubin J, Barrera SE. 1941**

Effects of electric convulsive therapy on memory. *Proc Soc Exp Biol Med* 48:596-597



